

**Inhibitoren des Angiotensin Converting Enzyme (ACE)
in hypoallergenen Säuglingsnahrungen**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden

von

Diplom-Lebensmittelchemikerin Melanie Martin
geboren am 22. August 1978 in Kronach

Gutachter: Prof. Dr. T. Henle
Prof. Dr. A. Deußen
Prof. Dr. H. Meisel

Eingereicht am: 10.10.2008

Tag der Verteidigung: 08.12.2008

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Henle, Direktor am Institut für Lebensmittelchemie der TU Dresden, für die interessante Themenstellung, der Betreuung und den interessanten und aufbauenden Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. A. Deußen, Direktor am Institut für Physiologie der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus, möchte ich für die Möglichkeit danken einen Teil meiner Arbeit im Institut für Physiologie durchführen zu können, sowie für die intensive fachliche und stets freundliche Unterstützung.

Weiter gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. A. Deußen und Herrn Prof. Dr. H. Meisel, Direktor am Max Rubner-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel in Kiel, für die freundliche Übernahme der Korreferate.

Für die engagierte Mitarbeit im Rahmen ihrer Diplomarbeiten danke ich Anke Kickstein, Ilka Timm, Anne Wellner, Anja Teichmann, Karola Böhme, Antje Wetzels, Nadine Solbrig und Ines Ossowski.

Bei meinen ehemaligen Arbeitskollegen am Institut für Lebensmittelchemie möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Vor allem meiner Labor-Mitbewohnerin Uta Schwietzke, für diverse Gespräche und einem sehr angenehmen Arbeiten. Und auch Frau Paul, Frau Schlosser und Dr. Uwe Schwarzenbolz sei besonders gedankt.

Ganz spezieller Dank als ehemalige Arbeitskollegin, Diplomarbeitbetreuerin und sehr gute Freundin gilt Anke. Danke für die fachlichen und auch nicht-fachlichen Diskussionen und für das geduldige Zuhören bei kleineren und größeren Problemen. Und nicht zu vergessen, die optimale Versorgung mit stets aufmunternden Worten, Schokolade, Gummibärchen und sonstigen Leckereien.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Physiologie, die mich von Anfang an sehr freundschaftlich aufgenommen und bei meiner experimentellen Arbeiten stets unterstützt haben. Besonders für die Präparation der HUVECs, diversen Messungen im Rahmen der Fütterungsstudie und den vielen Hilfestellungen im Labor, danke

Danksagung

ich Anett Jannasch, Bianca Müller, Annette Pexa und Sandra Tuchscheerer-Hoffmeister. Ebenso ein großer Dank an die Kaffee-Runde, in der ich sofort herzlich aufgenommen wurde.

Ein sehr großes Dankeschön möchte ich an Birgit Zatschler richten, die mich bei der Tierstudie unterstützte. Danke für die produktive und schöne Zusammenarbeit. Auch wenn die Arbeit mit den Tieren sich manchmal schwierige gestaltete (was allerdings selten vorkam), konnte ich mich immer auf Ihre Unterstützung verlassen. Eine bessere Kollegin hätte ich mir nicht wünschen können.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinem Freund René, für seine Geduld und Zuspruch vor allem in den schwierigen Phasen meiner Doktorarbeit, sowie für die liebevolle Unterstützung und Motivation bedanken.

Nicht vergessen möchte ich meine Freunde, im Besonderen Bino, der mir schon seit Studienbeginn ein sehr guter Freund war und auf dessen Hilfe und Motivation immer Verlass ist. Danke für das Ertragen mancher Launen und die fränkische Unterstützung in der Ferne.

Enormer Dank gilt auch meiner Sandkastenfreundin Julia, für die vielen stundenlangen Telefonate, die so wichtig für mein Seelenheil sind. Und dafür, dass trotz Entfernung unsere Freundschaft all die Jahre so fest geblieben ist.

Nicht zuletzt gilt ein großes Dankeschön meiner Familie, auf deren Unterstützung immer Verlass ist.

Danke

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielstellung	1
2	Theoretischer Hintergrund	3
2.1	Das Angiotensin Converting Enzyme (ACE)	3
2.1.1	Aufbau und Funktion	3
2.1.2	Regulation des arteriellen Blutdruckes	7
2.2	Synthetische ACE-Inhibitoren	10
2.3	ACE-inhibierende Lebensmittelinhaltstoffe	14
2.3.1	Vorkommen und Bildung	14
2.3.2	Bioverfügbarkeit	20
2.4	Milchersatznahrungen für die Säuglingsernährung	23
2.4.1.	Allgemeines	24
2.4.2	Hypoallergene Formelnahrungen	25
2.5	Methodische Aspekte	27
2.5.1	IC ₅₀ -Wert zur Bestimmung der ACE-Inhibierung	27
2.5.2	Tiermodell	30
3.	Material und Methoden	32
3.1	Chemikalien, Materialien und Geräte	32
3.1.1	Chemikalien	32
3.1.2	Material und Geräte	35
3.1.3	Untersuchungsmaterialien	37
3.2	Probenaufarbeitung	40
3.2.1	Entrahmung	40
3.2.2	Proteinfällung mit Acetonitril	40
3.3	Bestimmung der ACE-Aktivität	40
3.4	Analyse der Peptidverteilung mittels RP-HPLC	43
3.5	Analyse der Molmassenverteilung mittels Gelpermeationschromatographie	45
3.6	Identifizierung ACE-hemmender Verbindungen in Probe 3	46
3.7	Fraktionierung von Probe 3 mittels semi-präparativer RP-HPLC	47
3.7.1	Weiterführende Auftrennung der Fraktion 9 (Probe 3)	59
3.7.2	Bestimmung der Molmassen der Unterfraktion 9-3 mittels LC-ESI-TOF-MS	51
3.7.3	Identifizierung der N-terminalen Aminosäuren im Peptidverband	52

3.8	Bestimmung des Gesamtstickstoffgehalts nach Kjeldahl	53
3.9	Quantifizierung ACE-inhibierender Peptide in Probe 3	54
3.10	Charakterisierung der enzymatischen Hydrolyse des Molkenproteinpulvers Milei60 nach Patent EP 1 063 873 A1	56
3.10.1	Enzymatische Hydrolyse	56
3.10.2	Bestimmung des Hydrolyseverlaufs mittels GPC	57
3.10.3	Bestimmung des ACE-inhibierenden Effektes der Proteinhydrolysate	58
3.11	Untersuchungen zum Einfluss der Lagerung auf die ACE-Hemmung	59
3.11.1	Quantifizierung der α -N-(2-Furoylmethyl)-aminosäuren	59
3.11.1.1	Säurehydrolyse	59
3.11.1.2	RP-HPLC-Parameter zur Quantifizierung der FMAAs	60
3.11.2	Bestimmung der ACE – Aktivität	61
3.12	Inkubation ausgewählter Peptide mit Lactose	61
3.12.1	Quantifizierung der α -N-(2-Furoylmethyl)-aminosäuren	61
3.12.2	Bestimmung des ACE-hemmenden Effektes	62
3.13	Simulierte gastrointestinale Verdauung	62
3.13.1	Durchführung der simulierten gastrointestinalen Verdauung	63
3.13.2	Bestimmung des ACE-hemmenden Effekts	64
3.13.3	Bestimmung der Molmassenverteilung mittels GPC	65
3.14	ACE-Aktivitätsbestimmung <i>ex vivo</i> an humanen Nabelschnur-Endothelzellen	65
3.14.1	Isolierung und Kultivierung von HUVEC	65
3.14.2	Vorversuche	68
3.14.3	Durchführung des ACE-Aktivitätstest an HUVEC	69
3.15	Fütterungsstudie an spontan hypertensiven Ratten (SHR)	70
4	Ergebnisse und Diskussion	73
4.1.	ACE-Inhibierung <i>in vitro</i>	73
4.2.	Bestimmung des Hydrolysegrades der Molkenproteine in HA-Nahrungen über die Molmassenverteilung mittels Gel-Permeationschromatographie	78
4.3	Identifizierung potentester ACE-Inhibitoren in hypoallergenen Säuglingsnahrungen	85
4.4	Quantifizierungen ACE-inhibierender Peptide in hypoallergenen Säuglingsnahrungen	93
4.5	Studien zum Einfluss der Herstellung von Molkenproteinhydrolysaten auf den ACE-hemmenden Effekt	100

4.5.1	Charakterisierung des Hydrolyseverlaufs eines Molkenpulvers mittels GPC	102
4.5.2	Untersuchungen zur Entwicklung des ACE-hemmenden Effektes des Molkenproteinhydrolysates während 48-stündigem Verdau	105
4.6	Untersuchungen zur Lagerung der hypoallergenischen Säuglingsnahrungen	106
4.6.1	Untersuchungen zum Einfluss der Lagerung auf das ACE-hemmende Potential der Probe 3	107
4.6.2	Ablauf der Maillard-Reaktion in Inkubationen mit Lactose und ausgewählten Peptiden	112
4.7	Untersuchungen zur simulierten gastrointestinalen Verdauung	114
4.7.1	Einfluss der ausgewählten Säuglingsnahrungen HA3 und KP3 auf die ACE-Aktivität nach simulierter gastrointestinaler Verdauung	115
4.7.2	Untersuchungen des Hydrolyseverlaufes der Säuglingsnahrungen HA3 und KN3 mittels GPC	116
4.7.3	Untersuchungen zur Stabilität ausgewählter Peptide während simulierter gastrointestinaler Verdauung	120
4.8	Einfluss ausgewählter Peptide sowie hypoallergener Säuglingsnahrungen auf die ACE-Aktivität in kultivierten humanen Endothelzellen (HUVECs)	123
4.8.1	Enzymkinetische Parameter der ACE-Aktivität in HUVECs	124
4.8.2	Bestimmung des Effektes unterschiedlicher Substanzen auf die ACE-Aktivität in HUVECs	128
4.9	Fütterungsstudien an spontan hypertensiven Ratten (SHR)	130
4.9.1	Allgemeiner Ablauf der Fütterungsstudie	131
4.9.2	Fütterungsstudien zur Blutdruckentwicklung	136
4.9.2.1	Versuchsreihe 1	137
4.9.2.2	Versuchsreihe 2 und 3	141
4.9.3	Zusammenfassung der Ergebnisse der Fütterungsstudie für alle Versuchstiere	144
4.10	Schlussfolgerungen	150
5	Ausblick	155
6	Zusammenfassung	159
7	Literaturverzeichnis	162

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ASA	Aminosäureanalyse
AU	arbitrary unit
BSA	bovine serum albumin; Rinderserumalbumin
BW	Blindwert
Da	Dalton
DAD	Diodenarraydetektor
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Enzym
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Enzym-Inhibitor-Komplex
ES	Enzym-Substrat-Komplex
ESI	Elektronensprayionisation
ESI-TOF-MS	electrospray ionization - time of flight - mass spectrometry
et al.	et alii (lat.) – und andere
gACE	germinales ACE
HA	hypoallergen
HHL	Hippuryl-L-Histidyl-Leucin (Hip-His-Leu)
HipLys	N ^α -Hippuryl-L-lysin
Hipsr	Hippursäure
HPLC	high pressure liquid chromatography
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
I	Inhibitor
IC ₅₀	notwendige Inhibitorkonzentration zur Senkung der Enzymaktivität um 50 %
k	Geschwindigkeitskonstante
KG	Körpergewicht
K _i	Inhibitorkonstante
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
LC	liquid chromatography; Flüssigkeitschromatographie
MS	Massenspektrometrie
Lsg	Lösung
m/z	Masse/Ladung

Abkürzungsverzeichnis

MP	Molkenpulver
M _r	relative monoisotopische Molekülmasse
MRP(s)	Maillard-Reaktions-Produkt(e)
NO	Stickstoffmonoxid
P	Produkt
RP	reversed phase – Umkehrphase
S	Substrat
sACE	somatisches ACE
TIC	total ion current; Totalionenstrom
TOF	time of flight; Flugzeitanalysator
UV	ultraviolett
v	Reaktionsgeschwindigkeit
VIS	visible, sichtbar
V _{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit

Tabelle 1: Übersicht über die proteinogenen Aminosäuren und deren Abkürzungen

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

1. Einleitung

Das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) spielt als Schlüsselenzym im Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) eine bedeutende Rolle bei der Blutdruckregulierung. ACE katalysiert unter anderem durch Abspaltung eines Dipeptids die Umsetzung des biologisch kaum aktiven Angiotensin I zu Angiotensin II und bewirkt dadurch einen Blutdruckanstieg. Durch die Hemmung des Enzyms wird wieder eine Absenkung des Blutdrucks erreicht. Daher werden ACE-Inhibitoren schon seit mehreren Jahren sehr erfolgreich zur Therapie der Hypertonie eingesetzt. Als Hypertonie wird laut WHO (World Health Organisation) ein Blutdruck höher 140 mm Hg systolisch und 90 mm Hg diastolisch definiert. Allerdings gilt schon ein dauerhafter Wert über 130 mm Hg systolisch und über 85 mm Hg diastolisch als bedenklich („Hoch-normaler Bereich“). Die arterielle Hypertonie zählt zu den Hauptrisikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen, die die häufigste Todesursache in den Industrieländern darstellt. In Deutschland befinden sich ungefähr 20 % der Bevölkerung bzw. sogar jeder zweite über 50 in Behandlung gegen Hypertonie. Wahrscheinlich liegt die Zahl der Erkrankten noch höher, da zunächst kaum eindeutige Symptome zu hoher Blutdruckwerte wahrgenommen werden. Allerdings ist auch schon bei dauerhaften Werten über 130/85 mm Hg mit pathophysiologischen Veränderungen in den Gefäßen zu rechnen. Die Gefahr weiterer Komplikationen wie Atherosklerose, Herzhypertrophie, Herzinfarkt oder auch Schlaganfall steigt nahezu linear mit erhöhten Blutdruckwerten. Die Gründe für die Entstehung der arteriellen Hypertonie sind bisher noch nicht geklärt. Neben vielen Faktoren wird die eigene Lebensweise, wie Rauchen, Stress, Bewegungsmangel, usw. als Entstehungsgrund diskutiert. Auch der Ernährung kommt dabei eine zentrale Rolle zu. Neben möglichst salz- und fettarmer Ernährung, gibt es inzwischen in mehreren europäischen Ländern (Finnland, Schweiz, Spanien) sowie in Japan funktionelle Milchprodukte, für die eine hypotensive Wirkung ausgelobt wird. Für diese, mit speziellen Mikroorganismen (*Lactobacillus helveticus*, *Aspergillus oryzae*) fermentierten Sauermilchprodukte konnte ein hypotensiver Effekt in klinischen Studien nachgewiesen werden. Als Grund für diese Wirkung wird die ACE-Hemmung durch die in den Produkten enthaltenen Tripeptide IPP und VPP angegeben. Die Inhibierung des ACE durch Peptide aus Nahrungsmittelproteinen ist schon lange bekannt (FitzGerald 1999, FitzGerald et al. 2004, Meisel et al. 1997, Pihlanto-Leppälä, 2004). So zeigten beispielsweise Meisel et al. (1997) den ACE-inhibierenden Effekt in Käse in Abhängigkeit von dessen Reifungsgrad. Neben anderen Milchprodukten zeigten sie auch einen hemmenden Effekt hervorgerufen durch

hypoallergene Säuglingsnahrung, charakterisierten diesen aber nicht weiter. Bei den hypoallergenen (HA) Säuglingsnahrungen handelt es sich um Ersatznahrungen, die zur speziellen Ernährung von Säuglingen dienen, die nicht gestillt werden und eine erhöhte Allergieatopie aufweisen. Daher werden in diesen Produkten Molkenproteine eingesetzt die vorher partiell hydrolysiert wurden, um den möglichen allergieauslösenden Effekt des intakten Proteins zu minimieren. Allerdings dienen diese Nahrungen nur zur Prävention und dürfen nicht bei schon bestehender Kuhmilchprotein-Allergie verabreicht werden, da in den Produkten noch immer intaktes Protein vorliegt. Da durch dieses Herstellungsverfahren viele kurzkettige Peptide in dem Produkt vorliegen und bekannt ist, dass aus der Sequenz der Milchproteine viele ACE-Inhibitoren resultieren, war es Ziel der vorliegenden Arbeit denn Effekt der HA-Nahrungen auf das ACE zu untersuchen. Die hemmende Wirkung - soweit vorhanden - sollte charakterisiert, sowie die inhibierenden Verbindungen identifiziert und quantifiziert werden. Abschließende Untersuchungen hinsichtlich möglicher hypotensiver Effekte sollten zunächst im Zellversuch sowie mit einer anschließenden Fütterungsstudie an spontan hypertensiven Ratten geklärt werden.

2. Theoretischer Hintergrund

2.1. Das Angiotensin Converting Enzyme (ACE)

Das Angiotensin-Converting Enzym (ACE); EC 3.4.15.1, u. a. auch als Dipeptidyl-Carboxypeptidase A, Dipeptidyl-Peptidase I oder Kininase II bezeichnet (*Das und Soffer, 1975*), spielt eine wichtige Rolle bei der Blutdruckregulierung im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System sowie dem Kallikrein-Kinin-System.

2.1.1 Aufbau und Funktion

ACE ist ein Glykoprotein, dessen Aufbau sich je nach Herkunft unterscheidet. Zu Forschungszwecken wird meist ACE aus der Kaninchenlunge isoliert. Dieses hat ein Molekulargewicht von 129 kDa, wobei die Oligosaccharidreste ca. 26 % ausmachen. Das Enzym besitzt einen hohen Anteil an hydrophoben Aminosäuren (44 % des Gesamtaminosäuregehaltes), während nur 1,2 % der Aminosäuren polare Seitenketten aufweisen. Aromatischen Aminosäuren, wozu Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan gehören, sind zu 11,9 % enthalten. ACE ist aus einer einzigen Polypeptidkette mit Alanin am C-terminalen Ende und Threonin am N-Terminus aufgebaut und gehört zu den Metallopeptidasen, da es ein Zinkatom als Cosubstrat enthält. Der Zinkgehalt pro mol Protein beträgt 1,19 g (*Das und Soffer, 1975*). Der hohe Anteil an hydrophoben Aminosäuren bewirkt, dass ACE membrangebunden vorliegt. Es ist vorwiegend auf der luminalen Oberfläche von Gefäßendothelzellen zu finden und kommt in verschiedenen Organen vor, wie z.B. in Gehirn, Herz, Dünndarm und verstärkt in der Lunge (*Das und Soffer, 1975; FitzGerald und Meisel, 2000; Koolman und Röhm, 1998*).

Von dem humanen ACE sind zwei Formen bekannt. Das somatische ACE (sACE) und das germinale ACE (gACE), wobei allerdings nur die somatische Form an der Blutdruckregulation beteiligt ist. Beide werden durch das gleiche Gen codiert. Das im somatischen Gewebe gebildete sACE besteht aus einem C-terminalen cytosolischen Bereich mit 30 Aminosäureresten, einem hydrophoben transmembranen Bereich (17 Aminosäurereste) sowie einem N-terminalen extrazellulären Bereich mit 1230 Aminosäureresten (Abbildung 2.1.1-1). Der größere extrazelluläre Teil des sACE gliedert sich in zwei homologe Untereinheiten, den sog. C- und den N-Bereich. Die germinale Variante des ACE wird ausschließlich in Spermienzellen gebildet. Bei dieser Form des ACE

fehlt im Gegensatz zum sACE der N-Bereich. *Wei et al. (1991)* zeigten, dass die germinale Form des ACE am Transport des Spermiums und an der Anheftung an die Eizelle beteiligt ist.

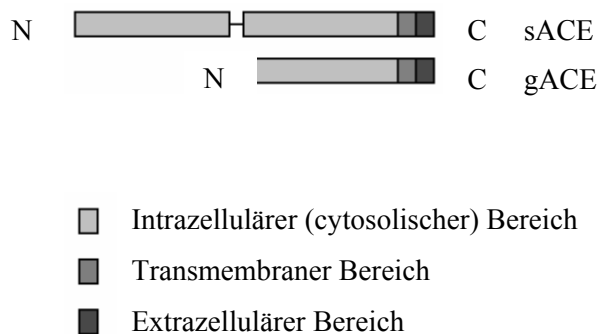


Abbildung 2.1.1-1: Schematische Darstellung der beiden humanen ACE-Varianten

Im Gegensatz zu der früheren Annahme, dass das ACE nur eine aktive Seite besitzt, gelang es *Wei et al. (1991)* zu beweisen, dass sowohl der C-Bereich als auch der N-Bereich des humanen ACE katalytisch aktiv ist. Beide Abschnitte sind in der Lage von den Substraten Angiotensin I und Hippuryl-histidyl-leucin Dipeptide abzuspalten. Auch zeigen beide Regionen eine absolute Zink-Abhängigkeit und sie werden durch die ACE-Inhibitoren Captopril und Enalapril vollständig gehemmt. Von relevanter Bedeutung ist dabei die ähnliche Aminosäuresequenz der beiden Bereiche (Abbildung 2.1.1-2). Die beiden Histidinreste His-361 und His-365 im N-Bereich sowie His-959 und His-963 im C-Bereich sind essentiell für die Enzymaktivität. Es wird vermutet, dass sie an der Zinkbindung beteiligt sind. Auch für die Glutaminsäurereste Glu-362 im N-Bereich sowie Glu-960 im C-Bereich wird angenommen, dass sie bedeutend für die Aktivität der entsprechenden Region sind (*Wei et al., 1991*).

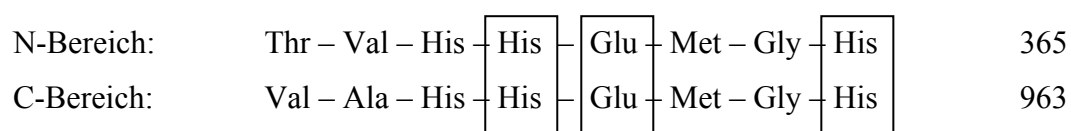


Abbildung 2.1.1-2: Darstellung der Aminosäuresequenzen des N- und C-Bereiches von humanem ACE (*Wei et al., 1991*)

Die beiden aktiven Seiten unterscheiden sich jedoch signifikant in ihrer Chlorid-Abhängigkeit. So ist die Aktivität des C-Bereiches stark von der Chloridkonzentration abhängig, während der N-Bereich auch bei Abwesenheit von Chlorid noch leicht reaktiv ist und bereits durch verhältnismäßig geringe Konzentrationen an Chlorid wieder vollständig

aktiviert wird. Der exakte molekulare Mechanismus der Chlorid-Aktivierung ist allerdings bislang noch ungeklärt. Es wird angenommen, dass Chlorid an einem Lysinrest im aktiven Zentrum oder in dessen Nähe bindet und so eine Konformationsänderung des Enzyms verursacht, welche schließlich den Enzym-Substrat-Komplex stabilisieren kann (*Jaspard et al., 1993; Wei et al., 1991*).

Das ACE ist in der Lage verschiedene Substrate umzusetzen, wobei die katalytischen Eigenschaften für diese Substrate erhebliche Unterschiede aufweisen. So zeigten *Bünning und Riordan (1983)*, dass für den Umsatz des Substrates Bradykinin im Vergleich mit Angiotensin I die Chloridionenkonzentration eine untergeordnete Rolle spielt. Nicht nur die Art des Substrates hat Auswirkung auf Aktivierung des ACE durch Chlorid-Ionen, sondern u. a. auch der pH-Wert (*Cheung et al., 1980*). Das pH-Optimum zur Spaltung von Hippuryl-histidyl-leucin, einem Substratanalogon zu Angiotensin I, liegt bei 7,8, verschiebt sich allerdings mehr in den basischen Bereich bei Zusatz von 300 mM Chlorid zu 8,3 – 8,8. Dabei konnte auch ein wesentlich höherer Umsatz ermittelt werden. Das Analogon des Bradykinins, Hippuryl-Phenylalanyl-Arginin, wird in Abwesenheit von Chlorid ebenfalls bei einem pH-Wert von 7,8 optimal umgesetzt, während bei Chlorid-Zugabe das pH-Optimum in einem weiten Bereich zwischen 6,5 bis 8,5 liegt. Die maximale Enzymaktivität wird bei pH 8,3 und 20 mM erreicht. Interessanterweise wird nicht für jedes Substrat eine Aktivierung durch Chloridionen hervorgerufen. So wurde gezeigt, dass die Hydrolyse von Hippuryl-Alanyl-Prolin bei pH 8,3 durch Zugabe von Chlorid sogar inhibiert wird. Ein pH-Wert von 7,8 in Abwesenheit von Chlorid ist auch für die Hydrolyse dieses Substrates optimal (*Cheung et al., 1980*).

Tabelle 2.1.1-1: Optimale Hydrolysebedingungen für verschiedene Substrate des ACE (*Cheung et al., 1980*)

	Substrat		
	Hip-His-Leu	Hip-Phe-Arg	Hip-Ala-Pro
pH-Optimum			
ohne NaCl	7,8	7,8	7,8
mit NaCl (300 mM)	8,3 – 8,8	7,5 – 8,5	6,9
Optimale Chlorid-Konzentration [mM]	300	20	0

Die Bindung der Substrate am aktiven Zentrum des ACE ist am Beispiel eines Peptids schematisch in Abbildung 2.1.1-3 dargestellt. Dabei wirkt das Zinkion als Lewis-Säure und polarisiert die C-O-Bindung des Substrates, wodurch die Spaltung dieser Peptidbindung

erleichtert wird. Eine weitere Stabilisierung wird erreicht indem die positiv geladene Arginin-Seitenkette mit der negativ geladenen Carboxylgruppe des Substrates wechselwirkt. Daneben ist wahrscheinlich ein Serinrest an der Fixierung des Substrates im aktiven Zentrum beteiligt, indem er Wasserstoffbrücken mit einer weiteren Peptidbindung ausbildet (*Auterhoff et al., 1999*).

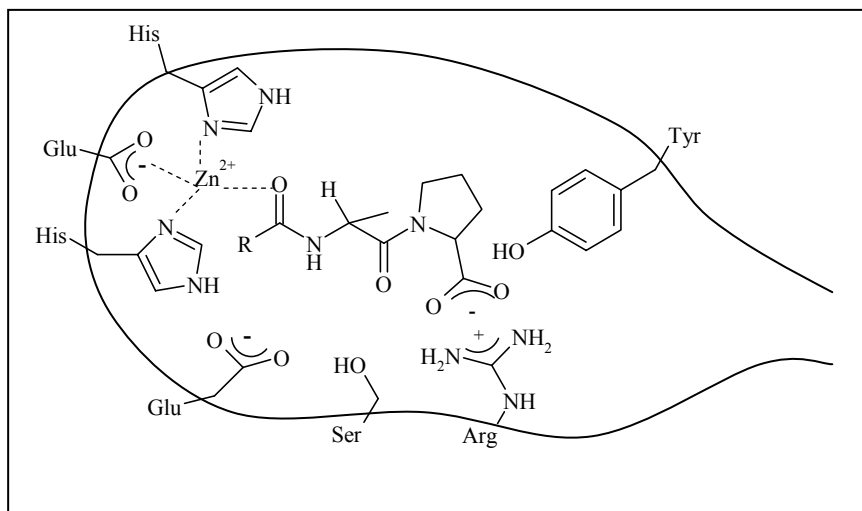


Abbildung 2.1.1-3: Bindung eines Peptids im aktiven Zentrum des ACE (*Auterhoff et al., 1999*)

Als Exopeptidase weist ACE eine relativ hohe Substratspezifität auf, wobei die Bindungsstärke erheblich durch die terminalen Aminosäurereste des jeweiligen Substrates beeinflusst wird. Am schwächsten werden dabei Substrate mit N-terminalen bzw. C-terminalen Dicarboxyl-Aminosäuren gebunden. Liegen aromatische Aminosäuren, wie Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin sowie die Iminosäure Prolin am C-Terminus vor, wird die Bindung am Enzym deutlich verstärkt. Dagegen ist Prolin am N-Terminus unvorteilhaft während verzweigte aliphatische Aminosäuren wie Valin und Leucin eine stärkere Bindung hervorrufen können (*Cheung et al., 1980*).

ACE zeigt eine sehr starke Affinität zu dem natürlichen Substrat Bradykinin. Wie schon oben dargelegt wird es selbst bei hohen Chlorid-Konzentrationen von beiden aktiven Seiten des ACE besser umgesetzt als Angiotensin I. Diese höhere Substratspezifität lässt sich mit der Aminosäuresequenz, die in Abbildung 2.1.1-4 dargestellt ist, erklären. Bradykinin besitzt im Gegensatz zu Angiotensin I keine saure Aminosäure (Asparaginsäure), welche die Bindung an das aktive Zentrum erschweren könnte. Die C-terminalen Aminosäuren des Bradykinins sind Prolin und Phenylalanin, die sich günstig auf die Bindung auswirken. Dagegen wirkt die Leucin-Seitenkette des Angiotensin I eher ungünstig (*Jaspard et al., 1993*).

Angiotensin I	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu
Bradykinin	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg

Abbildung 2.1.1-4: Aminosäuresequenz von Angiotensin I und Bradykinin

2.1.2 Regulation des arteriellen Blutdrucks

In diesem Kapitel werden die zwei wichtigsten Systeme zur Blutdruckregulation vorgestellt, das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und das Kallikrein-Kinin-System (KKS). In beiden spielt das im vorangegangenen Kapitel vorgestellte Angiotensin-Converting Enzym (ACE) für die Blutdruckregulation eine entscheidende Rolle.

Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Die wichtigsten Abläufe im RAAS sind in Abbildung 2.1.2-1 kurz dargestellt. Kommt es zu einer Senkung des Blutdrucks bzw. des Na^+ -Spiegels wird in der Niere Prorenin gebildet, zur Aspartyl-Protease Renin gespalten und ins Blut abgegeben. Renin spaltet dort die Peptidbindung des Plasmaproteins Angiotensinogen zwischen den Aminosäuren Leucin-Leucin. Durch diese Hydrolyse wird das Dekapeptid Angiotensin I freigesetzt und nach anschließender Abspaltung des C-terminalen Dipeptids Histidyl-Leucin durch ACE, entsteht das biologisch wirksame Oktapeptid Angiotensin II. Dieses Peptid wirkt sowohl als Hormon, wie auch als Neurotransmitter und wird schnell durch Peptid-spaltende Enzyme (Angiotensinasen) abgebaut. So beträgt die Halbwertszeit des Angiotensin II im Plasma ungefähr eine Minute (*Klinge und Silbernagl, 1994; Koolman und Röhm, 1998*). Alle Wirkungen des Angiotensin II führen direkt wie auch indirekt zu einer Erhöhung des Blutdrucks. So wirkt Angiotensin II direkt gefäßverengend, wodurch eine Blutdruckerhöhung erzeugt wird. Das Oktapeptid ist ein potenter Simulator des oxidativen Stresses in den Gefäßwänden. Damit kommt es durch Sauerstoffradikale zu einer gesteigerten Stickstoffmonoxid (NO) - Inaktivierung. Damit ist NO nicht mehr in der Lage neben anderen wichtigen Vorgängen im Organismus eine Relaxation der Gefäße zu bewirken. Zum anderen bewirkt Angiotensin II als Neurotransmitter am Hirnstamm und in den Endigungen des sympathischen Nervensystems eine Erhöhung des Gefäßtonus und stimuliert damit das Bedürfnis zu Trinken wie auch den Appetit auf Salz.

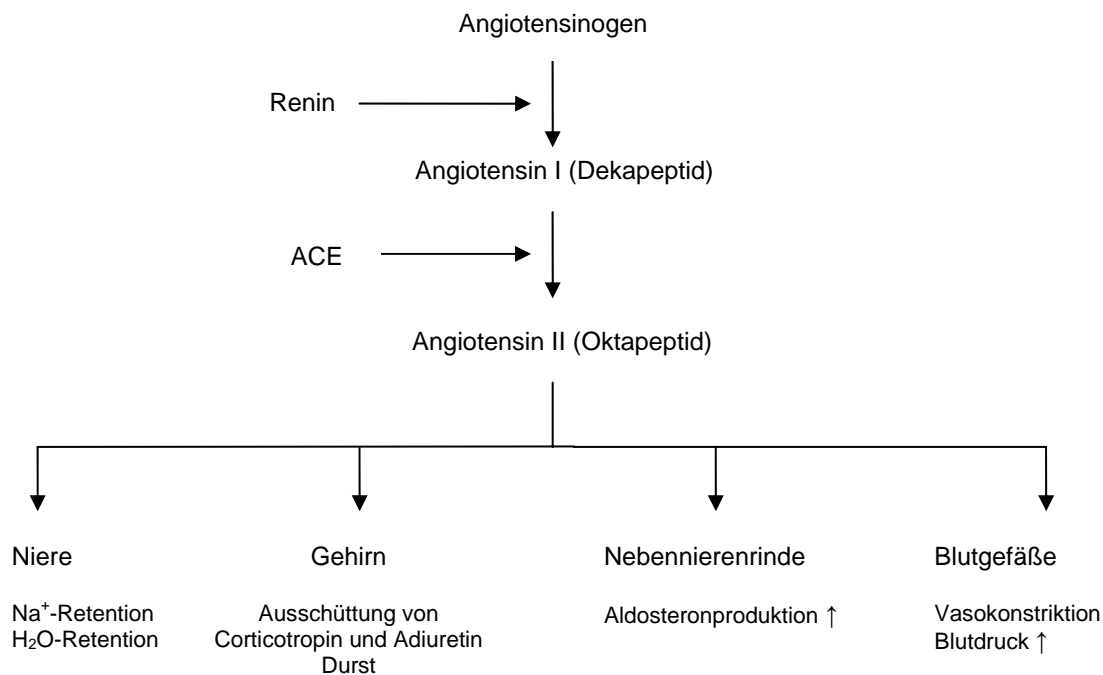


Abbildung 2.1.2-1: schematischer Ablauf der Vorgänge im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (Koolman und Röhm; 1998)

Die Retention von Na-Ionen und Wasser wird einerseits direkt durch Angiotensin II gefördert, das Peptidhormon stimuliert aber auch die Ausschüttung von Vasopressin und Corticotropin in der Hypophyse. Durch die Ausschüttung von Vasopressin, das auch antidiuretisches Hormon Adiuretin (ADH) genannt wird, kommt es zu einer Permeabilitätssteigerung der luminalen Zellmembran. Diese fördert in den diastalen Tubuli und den Sammelrohren der Niere eine Rückresorption von Wasser aus dem Primärharn. Die physiologische Wirkung des Corticotropin (adrenocorticotopes Hormon, ACTH) besteht darin, dass die Nebennierenrinde stimuliert wird und es vor allem zu erhöhter Produktion von Glucocorticoiden wie Cortisol und Corticosteron kommt. Des Weiteren löst Angiotensin II in der Nebennierenrinde die Biosynthese und Freisetzung des Steroidhormons Aldosteron aus. Dieses bewirkt eine Retention von Na-Ionen in den distalen Tubuli und begünstigt so die Ausscheidung von Kalium. Dies hat eine Wiederauffüllung des Extrazellulärvolumens zur Folge und bewirkt damit eine indirekte Blutdruckerhöhung auf langfristige Sicht (Klinke und Silbernagl, 1994; Koolman und Röhm, 1998). Die Wirkungen des Angiotensin II werden über spezifische membranständige Rezeptoren, hauptsächlich AT₁- und AT₂-Rezeptoren, vermittelt. Die Bindung des Oktapeptids an einen AT₁-Rezeptor führt zur Aktivierung eines G-Proteins. Dieses bewirkt die Hemmung der Adenylatcyclase und eine Aktivierung der Phospholipase C sowie der Phospholipase A₂. Dadurch kommt es zur Bildung so genannter second messenger,

die schließlich die intrazelluläre Wirkung des Angiotensin II vermitteln. AT₂-Rezeptoren sind unter anderem in der Nebennierenrinde, im Nebennierenmark, im Uterus und im Zentralen Nervensystem lokalisiert. Über die Funktion dieser Rezeptoren ist jedoch noch wenig bekannt (*Forth et al., 1998*). In diesem Blutdruck-Regulationssystem können an verschiedenen Stellen Inhibitoren eingreifen und somit die eben dargestellten Mechanismen verhindern. Renin kann beispielsweise durch Angiotensinogen-ähnliche Substanzen inhibiert werden. Substrat-Analoga des Angiotensin I hemmen dagegen das ACE kompetitiv. Auf diese Inhibitoren wird im Kapitel 2.3 näher eingegangen. Des Weiteren können die Angiotensin II-Rezeptoren durch Peptidhormon-Antagonisten blockiert werden, so dass eine Bindung des Peptids unterbunden wird und somit dessen Wirkungen nicht ausgelöst werden (*Klinge und Silbernagl, 1994; Koolman und Röhm, 1998*).

Kallikrein-Kinin System

Neben dem RAAS gilt auch das Kallikrein-Kinin-System, kurz KKS, als blutdruckrelevanter Mechanismus im Körper. Hier wird durch die im Blutplasma vorkommende Serin-Protease Kallikrein aus dem Kininogen ein potenter Vasodilator, das Kallidin, freigesetzt (vgl. Abbildung 2.1.2-2). Eine weitere Hydrolyse dieses Dekapeptides durch Kallikrein führt zu einem ebenso stark vasodilatorisch wirksamen Peptid, dem Bradykinin. Eine weitere Hydrolyse dieses Dekapeptides durch Kallikrein führt zu einem ebenso stark vasodilatorisch wirksamen Peptid, dem Bradykinin.

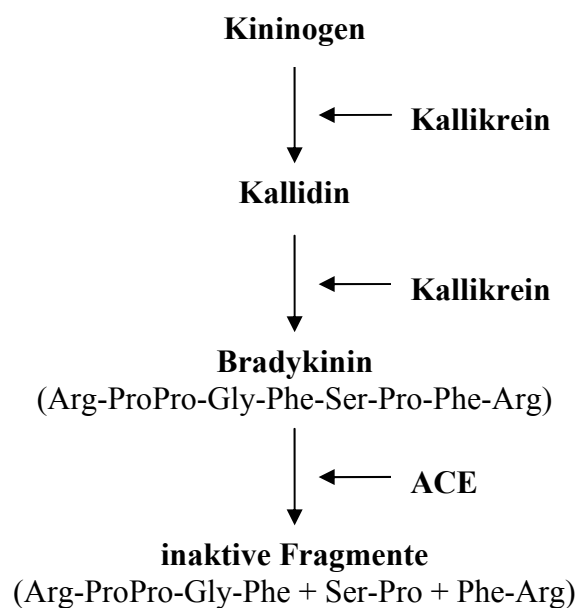


Abbildung 2.1.2.-2: schematische Darstellung der Abläufe im Kallikrein-Kinin-System (*FitzGerald et al., 2004*)

Die physiologische Wirkung der beiden Kinine beruht auf einer Bindung an membranständige β -Rezeptoren, die an G-Proteine gekoppelt sind. Durch Signaltransduktion kommt es zu einem intrazellulären Anstieg des Ca^{2+} -Spiegels mit anschließender Stimulierung der Stickstoffmonoxid-Synthase (NO-Synthase), die aus der Aminosäure L-Arginin Stickstoffmonoxid (NO) umsetzt. NO hat, wie schon oben erwähnt, einen entscheidenden Einfluss auf die Regulation des Gefäßwiderstandes, da es durch eine Aktivierung der Guanylat-Zyklase und so einen Anstieg von cGMP in den Muskelzellen eine Vasodilation der Gefäße auslöst. Die glatte Muskulatur erschlafft und daraus resultiert eine Absenkung des Blutdruckes (*FitzGerald et al., 2004; Li et al., 2004*). Aufgrund der hydrolytischen Spaltung des vasodilatorisch wirkenden Bradykinins, die durch das ACE katalysiert wird, wird dieses inaktiviert. Als Folge kommt es zu einer Senkung der Gefäßpermeabilität und damit zu einem Blutdruckanstieg (*FitzGerald et al., 2004; Li et al., 2004*).

Die physiologische Wirkung des Bradykinins geht auf Grund der allgemeinen geringen Halbwertszeit der Kinine im Plasma rasch verloren. Eine Inaktivierung erfolgt wie beschrieben durch die Abspaltung C-terminaler Dipeptide durch das ACE und hat eine Vasokonstriktion zur Folge.

2.2. Synthetische ACE-Inhibitoren

ACE ist eine Metalloprotease, also von Zinkionen abhängig, demzufolge führt eine Zugabe von Chelatbildnern wie EDTA zu einer reversiblen Inaktivierung des Enzyms (*Cushman und Cheung, 1971*). Durch Zugabe von zweiwertigem Cobalt, Zink oder Mangan kann das Enzym allerdings wieder teilweise bzw. auch vollständig reaktiviert werden. Ebenso sind Schwermetallionen in der Lage ACE zu inhibieren. Dabei kommt es zu einer Austauschreaktion des Zinkions gegen das jeweilige Metall und dadurch verliert das Enzym seine katalytische Wirkung. Von größerem Interesse sind jedoch ACE-Inhibitoren, die auch *in vivo* einen hypotensiven Effekt hervorrufen können. Im Jahre 1965 konnte mit einem nicht giftigen Ethanol-Extrakt vom Gift der Schlange *Bothrops jararaca* eine Bradykinin-ähnliche Wirkung erzeugt werden. Dieser Extrakt führte zu einer Kontraktion der glatten Muskulatur, einer erhöhten Kapillarpermeabilität und damit zur Blutdrucksenkung. Auf Grund dieser Wirkungen wurde der Effekt durch den Schlangengift-Extrakt auch als „bradykinin-potentiation-factor“ (BPF) bezeichnet (*Ferreira, 1965*). Es wurde angenommen, dass BPF aus einem oder mehreren Peptiden bestehen muss, die in den folgenden Jahren auch identifiziert

und isoliert werden konnten, welche aber nie alle nötigen Erfordernisse, die an ein blutdrucksenkendes Mittel gestellt werden, wie beispielsweise Stabilität gegenüber der gastrointestinalen Verdauung, zeigten (*Ferreira et al., 1970, FitzGerald et al., 2004*). Daher wurde intensiv an der Herstellung synthetischer ACE-Inhibitoren geforscht. Einige der resultierenden ACE-Hemmstoffe, die auch als blutdrucksenkende Medikamente eingesetzt werden, sind in Tabelle 2.2.2-1 dargestellt. Meist handelt es sich dabei um Peptid-analoge Verbindungen, die eine gute Bindung an das aktive Zentrum gewährleisten, allerdings nicht vom Enzym umgesetzt werden. Die erste synthetisch hergestellte Substanz, das Captopril besteht z.B. aus (S)-Prolin, welches amidartig mit (S)-3-Mercapto-2-methylpropionsäure verknüpft ist. Die ACE-Inhibitoren können nach verschiedenen Mechanismen reagieren und werden daher in zwei Hauptgruppen eingeteilt. Zum Einem Substanzen, die selbst bereits als ACE-Inhibitoren wirksam sind (wie Captopril und Lisinopril) und zum Anderem werden so genannte Prodrugs eingesetzt (bsp. Enalapril), die zunächst in einer inaktiven veresterten Vorstufe vorliegen und erst durch Metabolisierung in der Leber zu wirksamen Carbonsäuren hydrolysiert werden (vgl. Abbildung 2.2.2-1). Der zusätzliche Carboxylatrest übernimmt eine ähnliche Funktion wie die Captopril-Mercaptogruppe und wird am Zink-Kation gebunden.

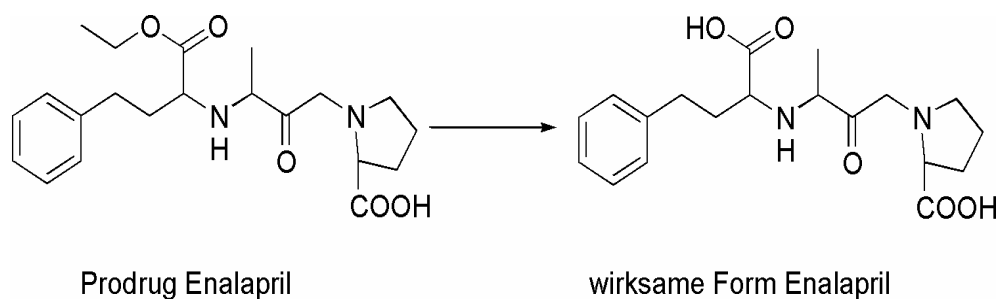
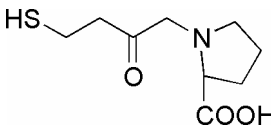
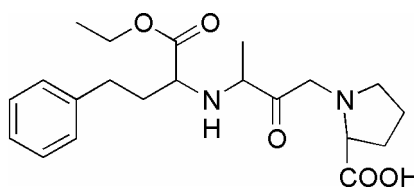
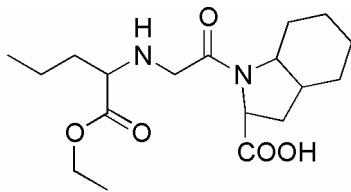
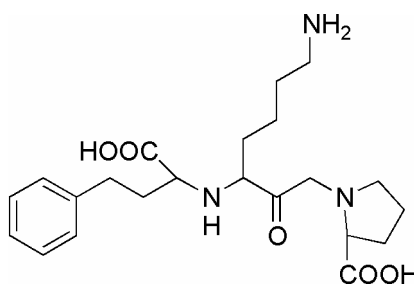


Abbildung 2.2.2-1: Metabolisierung des Enalapril zu seiner wirksamen Form (*Forth et al., 1998*)

Allen gleich ist die enorm starke ACE-Hemmung wie an den dargestellten IC_{50} -Werten (nötige Inhibitorkonzentration zur 50%igen Hemmung der Enzymaktivität) zu erkennen ist. Dadurch wird weder Angiotensin I zum biologisch wirksamen Angiotensin II abgebaut noch kommt es zur Hydrolyse von Bradykinin. Daraus resultiert die Absenkung des Blutdruckes. Das stark inhibierende Potential wird dadurch erreicht, dass die Substanzen keine spaltbaren Peptidbindungen besitzen, aber fest genug gebunden werden, um eine lang anhaltende kompetitive Inhibierung des Enzyms zu verursachen. Abbildung 2.2.2-2 verdeutlicht die

Wechselwirkung der C-terminalen Reste der verschiedenen Inhibitoren mit den Bindungsstellen S_1 , S_1' und S_2' der aktiven Seite des ACE.

Tabelle 2.2.2-1: Strukturen und IC_{50} -Werte einiger synthetischer ACE-Inhibitoren

Name	Struktur	* IC_{50} in nM (Zöllner, 1999)
Captopril		2,3
Enalapril		5,4
Perindopril		1,5
Lisinopril		0,63

* IC_{50} = nötige Inhibitorkonzentration zur 50%igen Hemmung der Enzymaktivität

Die neueren ACE-Hemmer enthalten keine Sulfhydrylgruppe. Die meisten, wie z.B. Lisinopril, sind allerdings in der Lage das Zink-Ion im aktiven Zentrum des ACE mit ihrer Carboxylgruppe zu binden. Andere wie das Fosinopril erreichen diese Bindung mit einer Phosphorylgruppe (Auterhoff *et al.*, 1999).

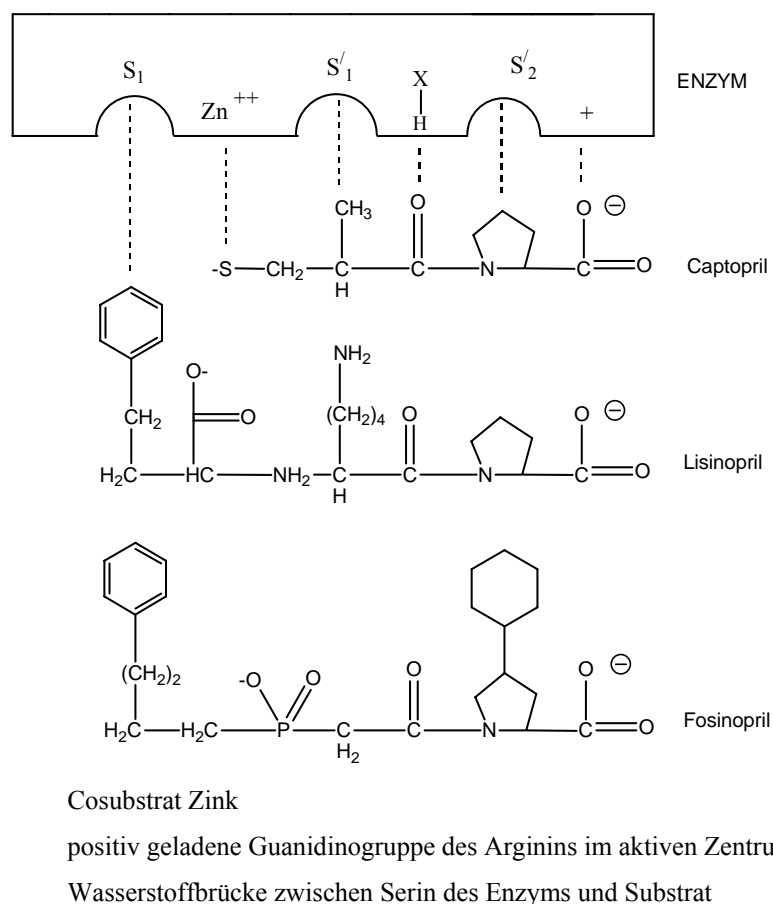


Abbildung 2.2.2-2: Bindungsmodell synthetischer Inhibitoren am aktiven Zentrum des ACE
(Micaud et al., 1997)

Wie schon in 2.1.1 beschrieben, zeigten verschiedene Studien, dass humanes Endothel-ACE zwei katalytisch wirksame Bindungsseiten aufweist (Jaspard et al., 1993; Wei et al., 1991; Wei et al., 1992), die jeweils unterschiedliche Bindungsaffinität mit kompetitiven Inhibitoren zeigen. In den Studien von Wei et al. (1992) wurde diese von verschiedenen synthetischen Hemmstoffen in Abhängigkeit von der Chloridkonzentration untersucht. Die Assoziation des Enzym-Inhibitor-Komplexes wurde bei beiden Bereichen durch die Chloridkonzentration nur wenig beeinflusst. Im Gegensatz dazu hat der Gehalt an Chloridionen einen starken Effekt auf die Dissoziation des Enzym-Inhibitor-Komplexes. Dabei ist der Einfluss (vgl. Kapitel 2.1.1) auf den C-Bereich viel größer, d.h. die Dissoziation wird geringer und daraus resultiert eine stärkere Hemmwirkung. Als Ausnahme ist das Captopril zu nennen, denn nur dieses wird bei niedriger Chloridkonzentration stark erhöht und auch bei hohen Chloridgehalten etwas besser an den N- als an den C-Bereich gebunden (Jaspard et al., 1993). Dies zeigt wiederum, dass die Chloridkonzentration nicht allein, sondern im Besonderen die Inhibitorstruktur ausschlaggebend für die Bindungsaffinität ist.

Die vorgestellten synthetischen Peptidanaloga zeichnen sich alle durch eine hohe Stabilität gegenüber gastrointestinalen und auch sonstigen proteolytisch wirksamen Enzymen des Körpers sowie eine gute und schnelle Resorption aus. Daher werden diese Verbindungen sehr häufig und mit großem Erfolg zur Behandlung der Hypertonie eingesetzt. Allerdings besitzen all diese Arzneimittel auch unerwünschte Nebenwirkungen, wie beispielsweise chronisch trockener Husten und auch Angioödembildung für die die Bradykinin-Akkumulation verantwortlich gemacht wird, da es durch die Hemmung des ACE zu einem verringerten Abbau dieses Kinins kommt (*Auterhoff, 1999*). Weiterhin wurden erhöhte Kaliumblutwerte, Hautausschläge, eine verringerte Nierenfunktion und auch Fehlgeburten auf Grund der Einnahme dieser Medikamente beobachtet (*FitzGerald et al., 2004*).

2.3 ACE-inhibierende Lebensmittelinhaltsstoffe

2.3.1 Vorkommen und Bildung

Auch Peptide natürlichen Ursprungs sind in der Lage das ACE zu inhibieren. Dabei sind die drei C-terminalen Aminosäuren eines Peptids entscheidend für das hemmende Potential. Untersuchungen diesbezüglich zeigten, dass Peptide mit C-terminalen aromatischen Aminosäuren bzw. Prolin eine besonders starke ACE-Inhibierung hervorrufen (*Cheung et al., 1980*). Ebenfalls günstig für die Hemmung wirken sich Aminosäuren mit aliphatischen, verzweigten Seitenketten am N-Terminus des Peptides aus. Im Gegensatz dazu sind saure Aminosäuren sowohl am C- als auch am N-Terminus ungünstig für eine inhibierende Wirkung.

Veranschaulicht werden diese Ergebnisse in Tabelle 2.3.1-1, in der ausgewählte Dipeptide mit entsprechenden IC_{50} -Werten dargestellt sind. *Cheung et al. (1980)* bestätigten die oben beschriebenen Hypothesen. Sie zeigten, dass das Dipeptid Val-Trp, das auf Grund ihrer Theorie ein sehr potenter ACE-Hemmer sein sollte, auch experimentell als der stärkste ACE-Inhibitor der untersuchten Dipeptiden ($IC_{50} = 1,6 \mu M$) eingestuft wird. ACE-inhibierende Peptide sind häufig in den Sequenzen der Milchproteine, daneben aber auch in Hydrolysaten von Algen, Sonnenblumenkernen, Sojaproteinen, usw. zu finden (*Li et al., 2004; Sato et al., 2003*).

Tabelle 2.3.1-1: IC₅₀-Werte ausgewählter Dipeptiden (Cheung et al., 1980; Sato et al. 2003)

	Peptid	IC ₅₀ [μM]
N-terminale Glycyl-Dipeptide	Gly-Trp	30
	Gly-Tyr	210
	Gly-Pro	450
	Gly-Phe	630
	Gly-Ile	1200
	Gly-Asp	9200
C-terminale Glycyl-Dipeptide	Val-Gly	1100
	Ile-Gly	1200
	Phe-Gly	3700
	Asp-Gly	14000
	Pro-Gly	17000
Andere Dipeptide	Val-Trp	1,6
	Ile-Trp	1,5
	Ile-Tyr	3,7
	Ile-Pro	130
	Ile-Phe	930

Nachfolgend wird im speziellen auf Milchproteine eingegangen. Diese lassen sich hinsichtlich der Löslichkeit in zwei Hauptgruppen einteilen. Die sedimentierbaren Fraktion besteht aus den so genannten Caseinen, dazu gehören die α_{S1} -, α_{S2} -, β - sowie κ -Caseine. Diese machen den Hauptteil von ungefähr 80% des Gesamtproteins der Milch aus. Die lösliche Proteinfraction (ca. 20%) entspricht den Molkenproteinen, die neben Immunglobulinen, Serumalbumin und Proteose-Pepton hauptsächlich aus den genetischen Varianten A und B des β -Lactoglobulin und dem α -Lactalbumin besteht (Cheftel et al., 1992). Zwischen der Aminosäurezusammensetzung der beiden Hauptproteinfractionen liegen deutliche Unterschiede. So sind in der Primärstruktur der Molkenproteine weniger Glutaminsäure- und Prolinreste enthalten, während mehr schwefelhaltige Aminosäuren wie Cystein und Methionin vorkommen. Ferner enthält α -Lactalbumin sehr hohe Mengen an Tryptophan (Cheftel et al., 1992). Bioaktive Peptide sind innerhalb der Proteinsequenz in beiden Hauptgruppen des Gesamtmilcheiweißes in inaktiver Form zu finden, werden aber nach hydrolytischer Spaltung als regulatorische Komponenten mit hormonähnlicher Aktivität wirksam. Dabei können unterschiedliche bioaktive Effekte durch diese Peptide hervorgerufen werden. Oft sind sie auch in der Lage mehrere Wirkungen hervorzurufen (Gobetti et al., 2004; Meisel, 1997). So wurden inzwischen opioide Peptide mit agonistischen als auch antagonistischen Wirkungen

und hypotensiven Effekten identifiziert. Ebenso konnten immunomodulatorische Reaktionen beobachtet werden, durch die es zur Stimulation der Proliferation menschlicher Lymphozyten oder der phagozytischen Aktivität von Makrophagen kommt. Auch mineralbindende Eigenschaften sowie antimikrobielle und antithrombotische Aktivitäten wurden bereits ermittelt (*Bachmann et al., 2003; Gobetti et al., 2004; Meisel, 1997; Shah 2000; Vermeirssen et al., 2004*). Tabelle 2.3.1-2 zeigt einige bioaktive Peptide und deren Wirkung.

Tab. 2.3.1-2: Biologisch aktive Peptide aus Milchproteinen (*Bachmann et al., 2003, Gobetti et al., 2004*).

Bioaktives Peptid	Fragment	Physiologische Wirkung
α -Casomorphine	α_{S1} -CN (f 90-95, 90-96, 91-96)	Opioidagonisten
α -Lactorphin	α -LA (f 50-53)	Opioidagonist
β -Lactorphin	β -LG (f 102-105)	Opioidagonist
Lactoferroxin	LF (313-323)	Opioidantagonist
	α_{S1} -CN (f 194-199)	immunstimulierend
	α -LA (f 18-20, 50-51)	immunstimulierend
	α_{S1} -CN (f 43-58, 59-79, 66-74)	mineralbindend
	β -CN (f 1-25, 7-18, 29-41, 33-48)	mineralbindend
Casocidin	α_{S2} -CN (f 165-203)	antimikrobiell
Lactoferricin	LF (17-41)	antimikrobiell
	LF (39-42)	antithrombotisch

ACE-hemmende Peptide aus der Primärsequenz der Caseine werden als Casokinine bezeichnet, Peptide aus Molkenproteinen, als Laktokinine. In Tabelle 2.3.1-3 ist eine Auswahl der wichtigsten bekannten Casokinine und Laktokinine aufgeführt. Es gibt offensichtlich keinen Zusammenhang zwischen dem inhibierenden Effekt und der Kettenlänge des Peptides. Zwar sind meist kleinere Peptide mit zwei bis vier Aminosäuren in der Lage das ACE zu hemmen, doch auch für längere Peptide konnten stark inhibierende Vertreter identifiziert werden. Diese aus Lebensmittelproteinen stammenden Inhibitoren weisen ein deutlich schwächeres inhibierendes Potential auf als synthetische Inhibitoren. In Anbetracht der Tatsache, dass im Allgemeinen allerdings größere Mengen an dem Lebensmittel in dem diese Peptide vorliegen aufgenommen werden, ist ein blutdrucksenkender Effekt *in vivo* dennoch realistisch.

Tabelle 2.3.1-3 Darstellung einiger Casokinine und Laktokinine mit entsprechenden IC₅₀-Werten

Protein	Fragment	Aminosäuresequenz	IC ₅₀ [μM]	Literatur
α _{S1} -casein	f(25-27)	VAP	2,0	[FitzGerald et al., 2004]
	f(146-147)	YP	720	[FitzGerald et al., 2004]
α _{S2} -casein	f(174-179)	FALPQY	4,3	[FitzGerald et al., 2004]
	f(198-202)	TKVIP	400	[FitzGerald et al., 2004]
β-casein	f(74-76)	IPP	5,0	[FitzGerald et al., 2004]
	f(84-86)	VPP	9,0	[FitzGerald et al., 2004]
	f(164-174)	KVLPVP	5,0	[FitzGerald et al., 2004]
κ-casein	f(185-190)	VTSTAV	52,0	[FitzGerald et al., 2004]
α-Lactalbumin	f(18-19), f(50-51)	YG	>1000	[FitzGerald, 1999]
	f(50-53)	YGLF	733	[FitzGerald, 1999]
	f(104-108)	WLAHK	77,0	[FitzGerald et al., 2004]
	f(52-53), f(99-108), f(104-108)	LF	349	[FitzGerald, 1999]
	f(105-110)	LAHKAL	621	[Pihlanto-Leppälä, 2004]
	f(59-60)	IW	1,5	[Sato et al., 2003]
β-Lactoglobulin	f(9-14)	GLDIQK	580	[Pihlanto-Leppälä, 2004]
	f(78-80)	IPA	141	[Pihlanto-Leppälä, 2004]
	f(102-103)	YL	122	[Jaspard et al., 1993]
	f(102-105)	YLLF	172	[Jaspard et al., 1993]
	f(104-105)	LF	349	[Jaspard et al., 1993]
	f(142-145)	ALPM	928	[Lopez-Fandino et al., 2006]

Protein	Fragment	Aminosäuresequenz	IC ₅₀ [μM]	Literatur
β-Lactoglobulin	f(142-148)	ALPMHIR	42,6	[FitzGerald et al., 2004]
	f(147-148)	IR	695	[FitzGerald, 1999]
Bovines Serumalbumin (BSA)	f(208-216)	ALKAWSVAR	3,0	[FitzGerald et al., 2004]
	f(221-222)	FP	205	[Fugelsang et al., 2003]
Lactoferrin	f(0-51), f(256-257), f(511-512)	AP	21	[Fugelsang et al., 2003]
	f(184-185)	AY	40	[Fugelsang et al., 2003]

Vor diesem Hintergrund beschäftigten sich Studien von *Meisel et al. (1997)* mit verschiedenen Milchprodukten und deren Wirkung auf die ACE-Aktivität. Es handelte sich dabei um Produkte, deren Proteine während der Herstellung einer mehr oder weniger starken Hydrolyse ausgesetzt waren. Allgemein zeigte sich, dass Proben mit einem niedrigen Hydrolysegrad, wie Joghurt, Frischkäse und Quark, eine geringe ACE-inhibierende Aktivität aufweisen. Produkte, deren Proteine stark hydrolysiert vorliegen, zeigten dagegen eine relativ hohe ACE-Hemmung. Hauptaugenmerk ihrer Studie war die Untersuchung unterschiedlich gereifter Käsesorten. Dabei zeigte sich, dass die ACE-inhibierende Wirkung bis zu einem gewissen Punkt mit steigendem Proteolysegrad der entsprechenden Käseprobe ansteigt, dann aber wieder sinkt, wie in Abb. 2.3.1-1 dargestellt. Der Einfluss des Proteolysegrades auf dem ACE-inhibierenden Effekt wird am Beispiel von Gouda-Käse besonders deutlich. Junger Gouda zeigt zwar auch eine Hemmung, allerdings nimmt diese im Laufe der weiteren Reifung zu, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es durch die weitere Proteolyse zur vermehrten Bildung ACE-inhibierender Peptide kommt. Nach weiterer Reifung des Käses scheint es allerdings wieder zu einem Abbau dieser Peptide zu kommen, da eine Absenkung der inhibierenden Wirkung zu beobachten war.

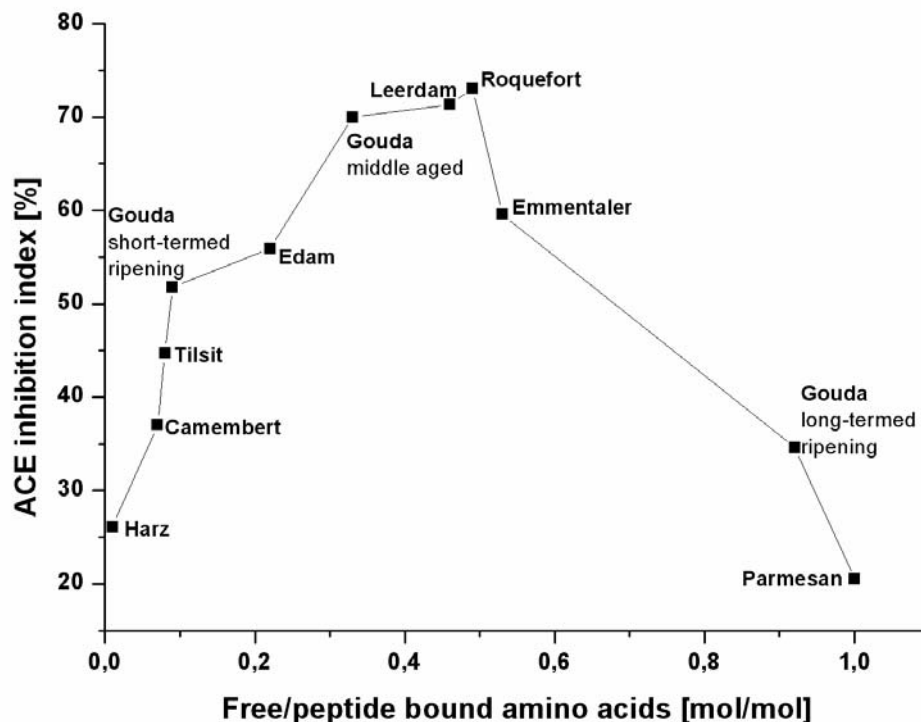


Abbildung 2.3.1-1: Abhängigkeit der ACE-inhibierenden Aktivität vom Proteolysegrad (Meisel et al. 1997)

Weitere Untersuchungen bezüglich der Bildung ACE-hemmender Lebensmittelinhaltsstoffe führten Nakamura et al. (1995) durch. Sie untersuchten ein fermentiertes Milchprodukt, in dem auf Grund der proteolytischen Aktivitäten der eingesetzten Starterkulturen bioaktive Peptide zu erwarten waren (Nakamura et al., 1995a). In ihren Untersuchungen verwendeten sie das japanische Sauermilchgetränk Calpis, bei dem zur Fermentation Starterkulturen eingesetzt werden, die *Lactobacillus helveticus* und *Saccharomyces cerevisiae* enthalten. Das Sauermilchgetränk zeigte eine sehr starke ACE-Hemmung und als inhibierende Faktoren konnten die beiden Tripeptide Val-Pro-Pro (VPP) und Ile-Prol-Pro (IPP) identifiziert und deren IC_{50} -Werte zu 9 μ M bzw. 5 μ M bestimmt wurden. Weiterführende Studien mit spontan hypertensiven Ratten (SHR) ergaben, dass nach Applikation dieser Tripeptide der systolische Blutdruck signifikant um -18 mm Hg nach achtwöchiger Aufnahme gesenkt wurde. Die Verabreichung der Peptide zeigte bei normotensiven Ratten dagegen keinerlei Auswirkung auf den Blutdruck (Nakamura et al., 1995b). Eine von Hirata et al. (2002) durchgeführte Humanstudie ergab, dass Calpis-Sauermilch bei täglicher Aufnahme von 100 ml Getränk nach acht Wochen ebenfalls zu einer signifikanten Blutdrucksenkung um -14 mm Hg bei Hypertonikern führt. Es konnten keine unerwünschten Nebenwirkungen wie Kopfschmerzen und trockener Husten beobachtet werden, die häufig bei der Behandlung mit synthetischen

Peptidanaloga auftreten (*Hirata et al., 2002*). Selbst eine sehr hohe Aufnahme der beiden Tripeptide VPP und IPP (9,1 mg bzw. 11,5 mg täglich), die ungefähr siebenmal der normalen Aufnahmemenge durch eine Portion Sauermilchgetränk entspricht, bewirkte keine signifikante Senkung des Blutdrucks bei normotensiven Personen. Ebenso kam es auch bei dieser sehr hohen Konzentration zu keinerlei Nebenwirkungen (*Kajimoto et al. 2001*). Mehrere Untersuchungen hinsichtlich der ACE-hemmenden Wirkung *in vivo* und damit einhergehender Blutdruckabsenkung bei Hypertonikern durch die Aufnahme dieser beiden Peptide folgten. Produkte, wie Calpis bzw. Evolus, sind inzwischen in Japan bzw. teilweise auf dem europäischen Markt (Finnland, Spanien, Schweiz) zu finden, die direkt mit dem gesundheitsfördernden Effekt dieser Produkte werben. ACE-inhibierende Peptide müssen aber nicht zwangsläufig durch technologische Verfahren während der Lebensmittelherstellung isoliert im Produkt vorliegen. Sie können auch erst während der gastrointestinalen Verdauung freigesetzt werden. Studien von *Hernández-Ledesma et al. (2004)* beschäftigten sich u. a. mit der ACE-inhibierenden Wirkung verschiedener kommerziell erhältlicher Säuglingsnahrungen vor und nach einer simulierten gastrointestinalen Verdauung. Ebenso wie *Meisel (1997)* zeigten auch bei ihnen die Produkte mit partiell hydrolysiertem Protein als Eiweißquelle eine ACE-Hemmung im Gegensatz zu den Nahrungen, in denen das Protein intakt vorlag. Nach dem simulierten Verdau konnte kein wesentlicher Unterschied in der Hemmwirkung für die Hydrolysat-Nahrung festgestellt werden. Doch für das Produkt mit intakten Proteinen wurde ein ACE-inhibierendes Potential während des gastrointestinalen Hydrolyseverlaufs ermittelt. Nachfolgende Identifizierungen der hemmenden Verbindungen ergaben, dass einige Peptide strukturelle Ähnlichkeiten zu bekannten ACE-Inhibitoren zeigten. Des Weiteren zeigten sie, dass ein Großteil der ursprünglich vorhandenen Peptide in der Säuglingsnahrung mit partiell hydrolysiertem Proteinanteil den gastrointestinalen Verdau intakt passierten, während nur wenige neue Peptide während der Hydrolyse gebildet wurden (*Hernández-Ledesma et al., 2004*).

2.3.2 Bioverfügbarkeit

Die meisten ACE-hemmenden Peptide bestehen aus 2 bis 20 Aminosäuren. Damit diese nach oraler Aufnahme eine blutdrucksenkende Wirkung ausüben zu können, müssen sie zunächst in aktiver Form ins Blut gelangen. Die Bioverfügbarkeit dieser Peptide ist also von enormer Bedeutung für deren Aktivität im Organismus (*Vermeirssen et al., 2004*). Zunächst müssen

sie resistent gegenüber gastrointestinalen Enzymen sein und im Darm resorbiert werden. Der erste Schritt der Proteinverdauung beginnt im Allgemeinen im Magen durch die Wirkung von Pepsin im sauren Milieu. Im Lumen des Dünndarms werden die daraus entstandenen Polypeptide bei alkalischen pH-Werten durch die Pankreas-Proteasen Trypsin, Chymotrypsin, Elastase und Carboxypeptidase A und B weiter aufgespalten. Dadurch entstehen hauptsächlich Oligopeptide, bzw. auch freie Aminosäuren. Die einzelnen Aminosäuren werden mittels Aminosäure-Transportsystem über die Bürstensaum-Membran in die Enterocyten absorbiert. Die Oligopeptide dagegen werden durch Bürstensaum-Membran-Peptidasen weiter hydrolysiert, wobei hauptsächlich freie Aminosäuren sowie Di- und Tripeptide entstehen, welche über ein spezifisches Peptidtransportsystem, den H^+ /Peptid-Symporter (PepT1) in die Enterocyten geschleust werden. Abbildung 2.3.2-1 veranschaulicht dieses Transportsystem. Durch das Zusammenspiel des Na^+/H^+ -Austauschers an der apikalen Membran der Epithelzellen (2) und der basolateral lokalisierten Na^+/K^+ -ATPase (1) entsteht der für den H^+ /Peptid-Symporter (3) nötige, zelleinwärts gerichtete Protonengradient (*Vermeirssen et al., 2004*).

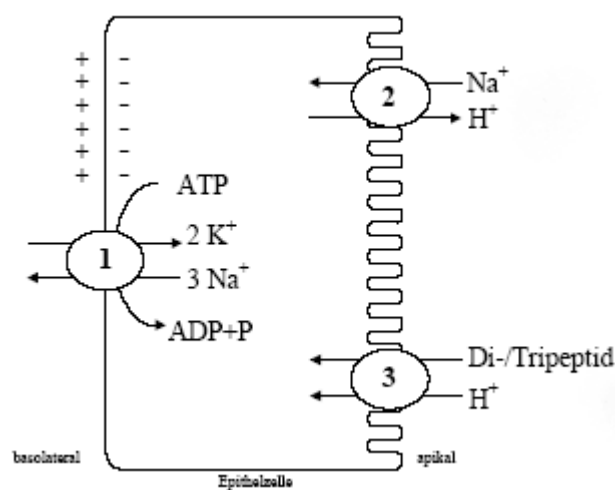


Abbildung 2.3.2-1: Schematische Darstellung des H^+ /Peptid-Symporter (*Vermeirssen et al., 2004*)

Gelangen Peptide in die Enterocyten werden sie dort meistens durch intrazelluläre Peptidasen in freie Aminosäuren gespalten. Die schließlich mit Hilfe spezifischer Aminosäuretransportsysteme die basolaterale Membran passieren und in die Pfortader eintreten. Daneben liegen aber auch signifikante Mengen kleiner Peptide vor, die dieser vollständigen Hydrolyse entgehen und intakt in den Blutkreislauf gelangen. Es bestehen mehrere Mechanismen, wie Peptide intakt durch die Darmmucosa transportiert werden können, wie in Abb. 2.3.2-2 dargestellt. Wasserlösliche und relativ niedermolekulare Peptide

werden beim parazellulären Transport (1) passiv, sowie energieunabhängig durch die tight junctions zwischen den Zellen transportiert. Stark lipophile Peptide dagegen sind in der Lage, über den transzellulären Weg zu diffundieren (2). Ein weiterer Mechanismus der Aufnahme, kann durch Endocytose (3) erfolgen (*Vermeirssen et al., 2004*). Daneben besitzt auch die basolaterale Membran Peptidtransporter (4), wodurch erreicht werden kann, dass kleine, hydrolyseresistente Peptide in die Pfortader abgegeben werden. Bei diesen dargestellten Mechanismen ist die Aufnahme umso wahrscheinlicher je kurzkettiger die bioaktiven Peptide sind (*Gardner et al., 1998*)

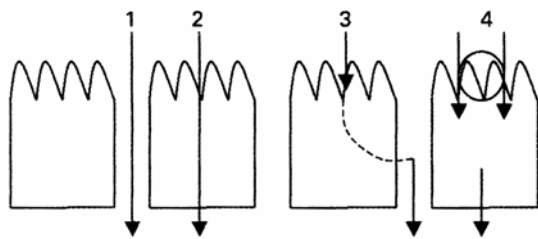


Abbildung 2.3.2-2 Mechanismen für den intestinalen Transport von Peptiden: (1) parazellulär, (2) passive Diffusion, (3) Endocytose, (4) Transport durch Carrier (*Vermeirssen et al., 2004*)

Peptide die in ihrer Sequenz Prolin oder Hydroxyprolin aufweisen, sind generell resistent gegen eine Hydrolyse durch Verdauungsenzyme. Dies erklärt warum mehrere *in vivo* wirksame bioaktive Peptide einen hohen Gehalt an Prolin aufweisen (*FitzGerald und Meisel, 2000*). Unverdaute bzw. nichtabsorbierte Peptide gelangen in den Dickdarm, wo eine Metabolisierung durch vorliegende Darmbakterien erfolgen kann. Ob jedoch eine Wirksamkeit ACE-inhibierender Peptide in diesem Fall noch vorliegt, ist bisher unbekannt (*Vermeirssen et al., 2004*). Die Bioverfügbarkeit von Captopril, ein häufig zur Therapie von Hypertonie eingesetztes Pharmazeutikum, wird mit durchschnittlich 65% angegeben (*Brown und Vaughan, 1998; Ferroni et al. 1996*). Weitere Untersuchungen hinsichtlich der Bioverfügbarkeit von Captopril ergaben ähnliche Absorptionsraten. *Morrison et al. (1997)* zeigten, dass nach Applikation von Captopril in den Magen von Ratten durchschnittlich 62% absorbiert werden. Basierend auf den Gehalt des ACE-Hemmers im Urin gaben sich eine durchschnittliche Bioverfügbarkeit von 26% im Zwölffingerdarm, 37% im Jejunum, 18% im Ileum und 15% Kolon an. Captopril weist eine peptid-analoge Struktur auf, so dass anzunehmen ist, dass auch ACE-hemmende Peptide im ähnlichen Ausmaß absorbiert werden und einen hypotensiven Effekt hervorrufen könnten. Für das stark ACE-hemmende Tripeptid VPP wurden durch die Arbeitsgruppe von *Satake et al. (2003)* erste Untersuchungen zu dessen transepithelialen Transport durchgeführt. Dabei wurden monozellulären Caco-2-Zell-

Schichten einer humanen Dickdarm-Adenocarcinom-Zelllinie als Modell für die Dünndarm-Epithelzellen verwendet. Es zeigte sich, dass der parazelluläre Weg als hauptsächlicher Transportmechanismus des intakten VPP vorherrscht, während der transzelluläre Weg über PepT1 nur eine untergeordnete Rolle spielt. Obwohl ein hoher Prolinanteil in dem Tripeptid vorliegt, wird aber dennoch ein gewisser Anteil durch intrazelluläre Aminopeptidasen gespalten. Unbedeutend ist hier die passive Diffusion, denn das Peptid ist mit nur drei Aminosäuren nicht ausreichend hydrophob (*Satake et al., 2003*). Auch das ACE-hemmende Peptid VY wird intakt resorbiert, wie Studien von *Matsui et al. (2006)* zeigten. Sie untersuchten neben der Resorption des Peptides auch deren Wirkung auf die Resorption des Captoprils. Dabei konnten sie zeigen, dass eine kombinierte Applikation der beiden ACE-Hemmer die Absorption des Captopril verringert und damit dessen blutdrucksenkende Wirkung abschwächt.

Ein nicht zu vernachlässigender Faktor für die Wirksamkeit bioaktiver Peptide ist deren Stabilität im Blut. Neben weiteren Enzymen liegen im Plasma auch Peptidasen vor, so dass die Halbwertszeiten einiger Peptide nur sehr kurz sind. Peptide mit ACE-inhibierenden Effekt *in vitro* dürfen allerdings nicht bzw. nur sehr langsam gespalten werden, um *in vivo* eine antihypertensive Wirkung zu zeigen (*Vermeirssen et al., 2004*).

Bei Säuglingen ist des Weiteren zu beachten, dass deren gastrointestinale Barriere noch nicht vollständig entwickelt ist, so dass intakte Peptide und selbst Proteine sehr viel besser absorbiert werden als es bei Erwachsenen der Fall ist. Ferner ist der gastrointestinale Verdau bei Säuglingen noch nicht vollständig entwickelt. Daher spielen bioaktive Milchpeptide in der Kindheit wahrscheinlich eine besondere physiologische Rolle und müssen für diese Konsumenten speziell untersucht werden (*Walker, 1995*).

2.4. Milchersatznahrungen für die Säuglingsernährung

In diesem Kapitel wird zunächst auf die Einteilung von Säuglingsnahrungen und deren Zusammensetzung eingegangen. Ferner werden Spezialprodukte, in diesem Fall hypoallergene (HA) Säuglingsnahrungen detaillierter vorgestellt.

2.4.1. Allgemeines

Die Ernährung des Säuglings ist nicht nur wichtig für ein optimales Wachstum. Sie soll auch vor Infektionen des Gastrointestinal-Traktes, der Atemwege und des HNO-Bereiches schützen, sowie das Immunsystem aufbauen. Daraus folgend kann die Kost des Säuglings den späteren Gesundheitszustand des Kindes und Erwachsenen entscheidend prägen. Mehrere Organisationen, u. a. die Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung (BZgA) empfehlen daher das Stillen des Säuglings in den ersten vier bis sechs Monaten, da Muttermilch meistens die oben dargelegten Anforderungen am besten erfüllt (*Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung (BZgA), 2001*). Muttermilch ändert sich in ihrer Zusammensetzung im Laufe der Laktation und ist in Folge dessen stets genau auf die Bedürfnisse des Säuglings abgestimmt. Neben allen wichtigen Nährstoffen enthält sie antiinfektiöse Substanzen und Wachstumsfaktoren sowie verdauungsfördernde Enzyme (*Henker, 2000*). Die Zusammensetzung der Muttermilch unterscheidet sich deutlich von Kuhmilch (Tabelle 2.4.1-1). Der größte Unterschied ist, neben dem deutlich geringeren Proteingehalt, auch in dessen Zusammensetzung zu finden. Im Gegensatz zu Kuhmilch, deren Eiweißanteil zu 80% aus Caseinen besteht, liegt in der Muttermilch größtenteils Molkenprotein (60%) in der Eiweißfraktion vor. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass Humanmilch einen deutlich höheren Laktose-Gehalt aufweist. Dieser fördert die optimale Ausbildung der Bifidusflora im Darm des Säuglings. Der Gesamtfettgehalt der Muttermilch unterscheidet sich zwar kaum von dem der Kuhmilch, doch ist auch hier die Zusammensetzung entscheidend. Denn sie enthält im Gegensatz zur Kuhmilch einen hohen Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Besonders hervorzuheben, sind hier Dodekahexaensäure (DHA, C 22:6 (4,7,10,13,16,19)) und Arachidonsäure (C 20:4 (5,8,11,14)). Diese dienen weniger dem Energiegewinn, als dass sie vielmehr wichtige Bestandteile von Zellmembranen sind und als Neurotransmitter fungieren (*Böhles, 2003; Henker, 2000*).

Tabelle 2.4.1-1: Zusammensetzung von Muttermilch und Kuhmilch (in g/100 g) (Berg und Bertel, 2006)

	Muttermilch	Kuhmilch
Gesamt-Protein	0,9	3,2
Casein	0,4	2,6
Molkenprotein	0,5	0,6
Zucker	7,1	4,6
Fett	4,5	3,9

Für Säuglinge, die nicht gestillt werden, stehen inzwischen industriell gefertigte Milchersatzprodukte zur Verfügung. Ausgangsprodukt zur Herstellung dieser Nahrungen ist Kuhmilch, die aufgrund ihrer Zusammensetzung den Bedürfnissen des Säuglings angepasst werden muss, so dass eine entsprechend nötige Versorgung gewährleistet wird (*Henker, 2000*). So genannte „adaptierte“ Säuglingsnahrungen dienen zur Ernährung des Säuglings von Geburt an und in den ersten vier Lebensmonaten. Anschließend sollten Folgenahrungen verabreicht werden, die den veränderten Bedürfnissen des Säuglings entsprechend angepasst wurden. Anfangsnahrungen mit der Vorsilbe „pre“ sind sowohl im Protein- als auch im Kohlenhydrat-Anteil der Muttermilch angepasst. Sie enthalten als einziges Kohlenhydrat Lactose und sind somit der Muttermilch am ähnlichsten. Im Gegensatz dazu liegen bei Anfangsnahrungen mit der Ziffer „1“ neben Lactose noch Stärke und gegebenenfalls weitere Kohlenhydrate wie Maltodextrin oder Glucose vor. Neben Nährstoffen enthalten Anfangsnahrungen bedarfsgerecht Vitamine, Mineralstoffe und Spurenelemente. Die genauen Anforderungen an adaptierte Nahrungen sind in der EG-Richtlinie vom 14. Mai 1991 (*Beck'sche Textausgaben, 1991*) verankert. Darin wird u. a. gefordert, dass diese Formulas einen Proteingehalt von max. 2,5 g/100 kcal (entspricht 1,8 g/100 ml) aufweisen. Des Weiteren muss das Verhältnis von Molkenprotein zu Casein mindestens 1:1 betragen, wenn Kuhmilch als Ausgangsprodukt verwendet wird. Als weitere Proteinquelle ist auch Soja zugelassen. Ab dem fünften Lebensmonat kann dem Säugling statt der Anfangsnahrung eine so genannte Folgenahrung gegeben werden. Diese mit „2“ bzw. „3“ gekennzeichneten Nahrungen sind der Muttermilch in ihrer Zusammensetzung weniger angepasst. Sie entsprechen einer 2/3 bis 3/4 Kuhmilchmischung mit modifizierten Fetten unter Zusatz von Kohlenhydraten, Vitaminen und Spurenelementen und besitzen daher höhere Protein-, Kohlenhydrat- und Mineralstoffgehalte als Muttermilch.

2.4.2 Hypoallergene Formelnahrungen

Konventionelle Säuglingsnahrungen, wie oben kurz beschrieben, basieren meist auf Kuhmilch und enthalten daher über 32 Proteine, die ein hohes allergenes Potential aufweisen (*Exl, 2001*). Schon lange ist bekannt, dass dieses durch die Hydrolyse der Proteine verringert werden kann (*Jost et al., 1987; Pahud et al., 1985*). Die dabei resultierenden freien Aminosäuren sind nicht allergen, allerdings weisen sie etliche negative Begleiterscheinungen, wie bitterer Geschmack oder auch hohe Osmolarität auf. Auch wegen der hohen Kosten, die bei dieser Art der Herstellung auftreten, sind solche „Voll-Hydrolysat-Nahrungen“ nicht als

Säuglingskost geeignet. Daher kamen Produkte auf den Markt, die nicht vollständiges hydrolysiertes Eiweiß enthielten. So genannte „extensiv hydrolysierte Formulas“ (eHF) werden zu therapeutischen Zwecken schon seit über 50 Jahren eingesetzt. Diese weisen sich dadurch aus, dass ihre ursprüngliche Allergenität um mindestens Faktor 1000 reduziert wurde (*Bauer et al., 2004*). Diese Nahrungen finden ihren Einsatz bei bestehender Kuhmilchproteinallergie (KMPA) bzw. allgemein bei Nahrungsmittelallergien (*Bauer et al., 2004*). Mitte der 80er Jahre wurde eine neue Art der Hydrolysatnahrungen entwickelt. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass die Hydrolyse deutlich geringer ausfiel und so zum Teil noch intaktes Protein bzw. Oligopeptide in den Produkten vorlagen. Ziel dieser Herstellung war, eine weitgehende orale Toleranz gegen Allergene der Kuhmilch zu erzeugen, aber den starken Bittergeschmack durch die geringer Hydrolyse zu verringern. Diese Produkte dienen nur der Prävention, können aber auf Grund ihres noch, wenn auch geringen, vorhandenen allergenen Potentials nicht bei bestehender Kuhmilchproteinallergie (KMPA) eingesetzt werden. Trotz mehrerer Studien hinsichtlich der primären Atopieprävention unterschiedlich stark hydrolysierter Säuglingsnahrungen liegen bis heute dafür keine exakten Angaben vor, da sich das Studiendesign zu stark unterschied, um die Ergebnisse der einzelnen Arbeiten direkt vergleichen zu können. Die Gesellschaft für Pädiatrische Allergologie und Umweltmedizin (GPA) und die Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAI) vertreten den Standpunkt, dass der Hydrolysegrad des eingesetzten Proteins nicht allein als Kriterium für eine Allergieprävention herangezogen werden kann, sondern dass die Nahrung als Ganzes zu sehen ist. Des Weiteren muss immer die Art der familiären Allergiebelastung berücksichtigt werden. Dennoch besteht die Möglichkeit, dass unabhängig vom Hydrolysegrad ein protektiver Effekt durch HA-Nahrungen besteht; es muss aber nicht der Fall sein (*Bauer et al., 2004*).

Inzwischen sind mehrere HA-Formulas unterschiedlicher Hersteller kommerziell erhältlich und jedes Produkt scheint ein eigenes Proteinhydrolysat zu verwenden, da keinerlei Information über die genaue Herstellung dieser vorliegen und auch nicht zu erhalten sind. Dennoch liegen einige Empfehlungen dazu vor. Eine Möglichkeit zur Herstellung einer HA-Säuglingsnahrung bietet beispielsweise das Patent EP 1 062 873 A1 (*Bindels et al., 2000*). Am aufwendigsten ist die Hydrolyse des Ursprungsproteins. Das Hydrolysat muss mehrere Bestimmungen erfüllen. Es müssen alle Aminosäuren enthalten sein, die für das Wachstum des Säuglings notwendig sind. Weiterhin müssen mindestens 50% der im Hydrolysat enthaltenen Proteinkomponenten aus 2 bis 30 Aminosäuren bestehen. Der verbleibende Eiweißanteil besteht aus freien Aminosäuren sowie Peptiden mit mehr als 30 Aminosäuren,

wobei diese Oligopeptide nur 0,5 bis 8 % ausmachen sollten. Zusätzlich sollte eine geringe Osmolarität, d.h. ein niedriger Gehalt an Salzen und freien Aminosäuren vorliegen, um gastrointestinalen Störungen bei Säuglingen entgegenzuwirken. Auch der sonst oft auftretende bittere Geschmack wird durch einen verringerten Anteil an freien Aminosäuren verhindert. Die wichtigste Anforderung ist die möglichst geringe Sensibilisierung durch das Protein-Hydrolysat. Als Ausgangsmaterial für die Hydrolyse wird ein Protein oder eine Proteinmischung mit einem Phosphorgehalt von $< 0,75 \text{ g/100 g}$ angegeben. Das heißt, dass Proteine aus Molke, insbesondere Sauermolke oder auch dephosphoryliertes Casein, β -Casein oder eine Mischung dieser Proteine eingesetzt werden können. Das Protein wird als solches oder auch in Lösung bzw. Suspension mit mindestens einer Endo- und einer Exopeptidase behandelt. Um kostengünstig zu arbeiten, wird empfohlen den Verdau unter Verwendung einer Kombination aller Enzyme in einem einzigen Schritt durchzuführen, es sind allerdings auch mehrere Einzelschritte möglich. Zur Hydrolyse wird eine Enzymmischung aus Serin-Proteasen (hier Alcalase®, Flavourzym® und Trypsin®), unterschiedlicher Konzentration empfohlen. Es sollte ein Temperaturbereich von 45 bis 60°C mit einem pH-Wert von 6,4 bis 8,0 eingehalten werden. Nach vorzugsweise 1,5 bis 3 h wird die Hydrolyse durch Abkühlen unter 20°C abgestoppt. Das entstandene Hydrolysat kann noch weiteren Behandlungsschritten, wie Dialyse, Säurefällung usw. unterzogen werden, um Komponenten wie freie Aminosäuren, Salze und die Verdauungsenzyme zu entfernen.

Zur Herstellung der Säuglingsnahrung werden schließlich die weiteren Zutaten, wie die Kohlenhydrat- und Fettkomponenten, Mineralstoffe, Vitamine, usw. zugemischt, wobei das Hydrolysat zu 1 bis 3 g in 100 ml der fertigen Säuglingsnahrung enthalten sein sollte. Nach Hitzebehandlung zur Erhöhung der Haltbarkeit wird die Säuglingsnahrung durch Sprühtrocknung in Pulverform gebracht und schließlich aseptisch verpackt (*Bindels et al., 2000*).

2.5 Methodische Aspekte

2.5.1 IC₅₀-Wert zur Bestimmung der ACE-Inhibierung

Zur Charakterisierung eines Inhibitors ist nicht nur die Art der Hemmung von Interesse, sondern primär die Stärke des hemmenden Effektes. Aussagen darüber wie hoch dieser ist, können über die Substratabnahme bzw. Produktzunahme in einem definierten Zeitrahmen mit

und ohne Inhibitorzusatz getroffen werden. Die Angaben über das hemmende Potential erfolgen in Prozent entweder als Inhibierung oder als Restaktivität, wobei der Wert ohne Inhibitor einer 100 %igen Restaktivität, bzw. 0 %igen Inhibierung entspricht. Ein häufig verwendeter Parameter zur Einordnung eines Inhibitors in Bezug auf seine Hemmstärke, stellt der IC_{50} -Wert dar. Dieser beschreibt die Konzentration an Hemmstoff bei der die Restaktivität des Enzyms nur noch 50 % beträgt (Copeland, 1996). Die Bestimmung des IC_{50} -Wertes erfolgt, wie in Abbildung 2.5.1-1 beispielsweise dargestellt, über Konzentrations-Aktivitäts – Kurven, in denen die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der InhibitorKonzentration verdeutlicht wird. Mittels entsprechender Funktion kann der IC_{50} – Wert mit Hilfe von Computerprogrammen einfach ermittelt werden.

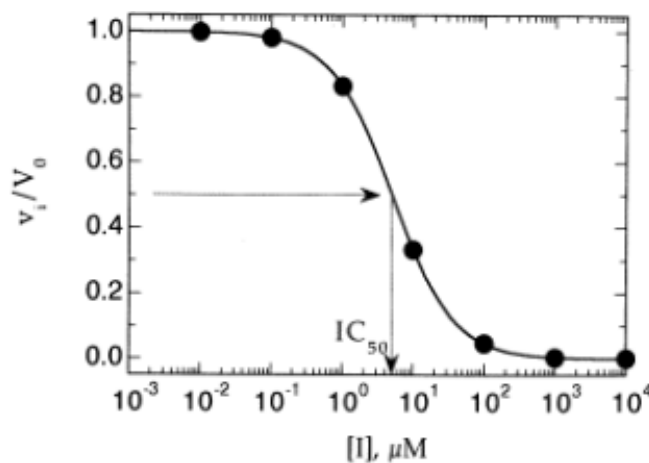


Abbildung 2.5.1-1: Konzentrations- Aktivitäts - Kurve für eine Enzym-Inhibitor-Reaktion zur Bestimmung des IC_{50} -Wertes (Copeland, 1996)

Da die Ermittlung des IC_{50} -Wertes relativ einfach und schnell durchzuführen ist, ist dieser ein viel verwendeter Parameter für die Charakterisierung eines Inhibitors. Allerdings ist ein Vergleich der IC_{50} -Werte unterschiedlicher Quellen problematisch, da dieser von der gewählten Substratkonzentration und anderen Lösungsmiteleigenschaften abhängig ist. Abbildung 2.5.1-2 zeigt beispielsweise den veränderten Kurvenverlauf der Reaktion für einen kompetitiven Inhibitor, wenn eine höhere Substratkonzentration gewählt wurde. Trotz der identischen hemmenden Verbindung wurde bei einem höheren Anteil an Substrat auch ein höherer IC_{50} -Wert ermittelt, was einer schlechteren Inhibierung entsprechen würde. Daher ist es unbedingt nötig, dass für den Enzymtest identische Bedingungen vorliegen, wenn IC_{50} -Werte verglichen werden sollen.

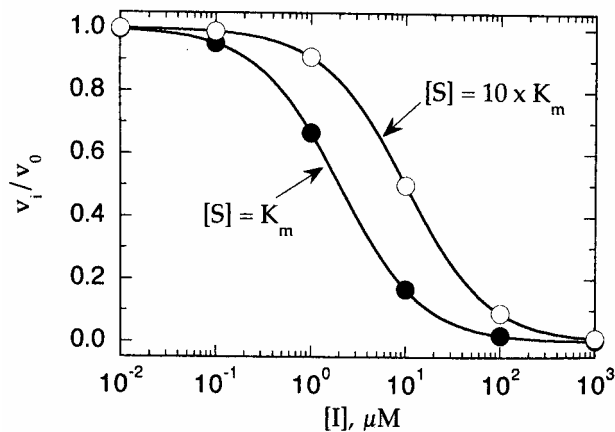


Abbildung 2.5.1-2: graphische Darstellung des Zusammenhangs der Substratkonzentration und dem IC₅₀-Wert eines kompetitiven Inhibitors (Copeland, 1996)

Ein Parameter, der von diesen äußeren Faktoren unabhängig ist, ist die Inhibitorkonstante K_i , die der Dissoziationskonstante des Enzym – Inhibitor – Komplexes entspricht. Durch die Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Substratkonzentration bei Einsatz verschiedener Inhibitorkonzentrationen wird der Wert für K_i ermittelt (Copeland, 1996).

Zwischen der Inhibitorkonstante und dem IC₅₀-Wert besteht je nach Hemmart folgender Zusammenhang (Copeland, 1996):

a) kompetitiver Inhibitor:
$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_M}}$$

b) nichtkompetitiver Inhibitor:
$$K_i = IC_{50}$$

c) unkompetitiver Inhibitor:
$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{K_M}{[S]}}$$

(wenn $[S] \gg K_M$, dann $K_i \approx IC_{50}$)

2.5.2 Tiermodell

Für die Durchführung einer Fütterungsstudie wurden als Tiermodell spontan hypertensive Ratten (SHR; Züchter: Charles River) eingesetzt. Diese zählen zu dem am häufigsten untersuchten Tiermodell in der experimentellen Forschung bei Hochdruckerkrankungen, da vielfältige Parallelen zwischen der essentiellen Hypertonie des Menschen und der der SHR vorliegen, wie z. B. Ähnlichkeiten im Verlauf der Hochdruckentwicklung. Auch Folgeschäden auf Grund des hohen Blutdruckes sind bei SHR ähnlich wie beim Menschen, wie beispielsweise zerebrale Infarkte, sowie Myokardinfarkte, -fibrosen und auch Nephrosklerose (*Ganten, 1987*). Auch zeigen die Tiere eine Blutdrucksenkung, wenn sie mit Medikamenten, die in der Humanmedizin eingesetzt werden, therapiert werden.

Die Entstehung dieses Stammes geht auf *Okamoto und Aoki (1963)* zurück. An der Universität von Kyoto wurden die SHR aus einer Kolonie von Wistar-Ratten gezüchtet, die meistens als normotensive Kontrolle im Tierexperiment verwendet werden. Dabei wurde ein männliches Tier mit einem systolischen Blutdruck von 145 – 175 mm Hg, was stark über den Durchschnitt von 120 – 140 mm Hg liegt, ausgewählt und mit einem normotensiven weiblichen Tier verpaart. Unter dem Nachwuchs wurden die Tiere ausgesucht, die über einen Monat einen Blutdruck über 150 mm Hg aufwiesen. Diese wurden wiederum miteinander gekreuzt, so dass nach mehrmaliger (mindestens 20mal) Bruder-Geschwister-Verpaarung der Stamm der SHR entstand (*Okamoto und Aoki, 1963*). Die Tiere entwickeln ungefähr ab der fünften bis siebten Lebenswoche eine essentielle Hypertonie, die bis ungefähr bis zur zwölften - vierzehnten Woche Lebensalter ansteigt und anschließend gleich bleibt. Dabei werden in der Regel systolische Blutdruckwerte über 180 mm Hg erreicht. Größtenteils ist die Blutdruckerhöhung auf eine Zunahme des peripheren Widerstandes zurückzuführen. Zunächst verursacht dies eine neurogen bedingte Vasokonstriktion, später spielen strukturelle Gefäßveränderungen eine weitere Rolle (*Dickhout et al., 1998*). Folgeschäden auf Grund des hohen Blutdruckes sind zerebrale Infarkte, Myokardinfarkte, Myokardfibrosen und Nephrosklerosen. Dadurch erreichen die SHR auch nur eine Lebenserwartung von ungefähr 18 Monaten. Im Gegensatz dazu werden normotensiven Tiere in der Regel 24 Monate alt oder sogar älter. Obwohl dieses Tiermodell schon lange bekannt ist, fehlt eine vollständige Aufklärung der Hypertonusentwicklung bis heute.

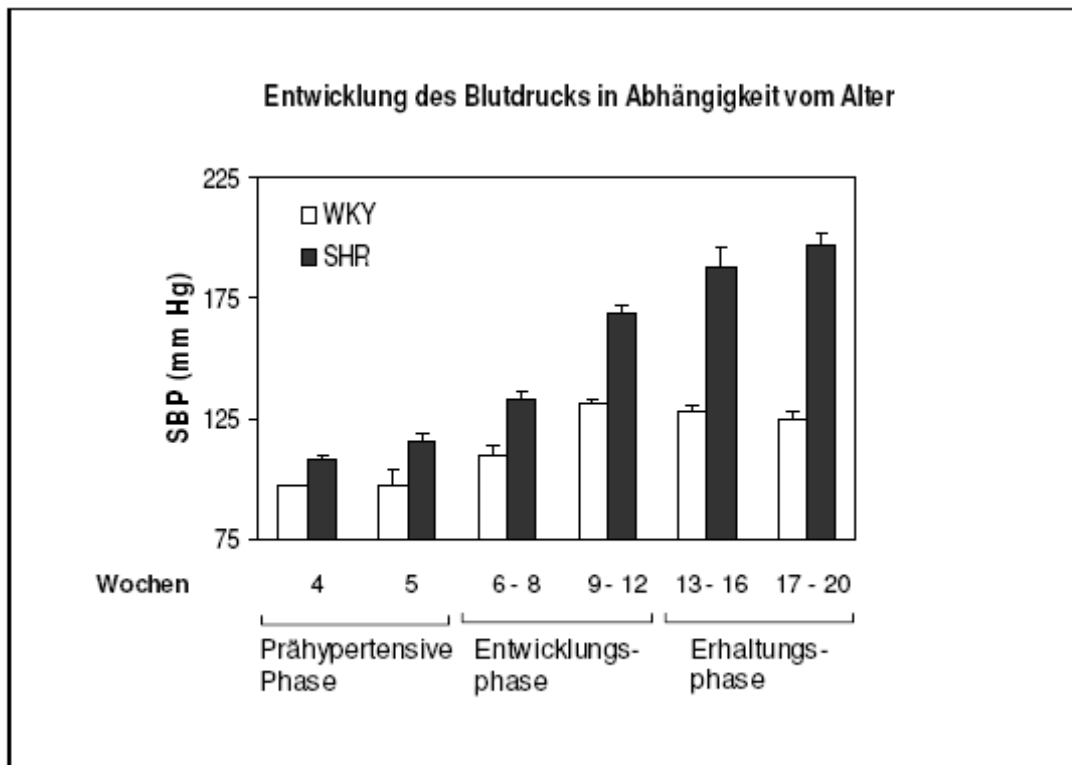


Abbildung 2.5.2-1: Gegenüberstellung der Entwicklung des systolischen Blutdrucks (SBP) in männlichen spontan hypertensiven Ratten (SHR) und Wistar Kyoto Ratten (WKY) (Okamoto und Aoki, 1963)

Es wird aber angenommen, dass eine Fehlfunktion zentraler Regulationsmechanismen der Auslöser ist. Verdichtet wird diese Annahme durch Veränderungen bei den SHR im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), im noradrenergen System, sowie in der Vasopressin- und Oxytozinausschüttung (Salaymeh *et al.* 1986; Wijnen *et al.*, 1980). Des Weiteren gibt es Hinweise, dass ein gestörter L-Arginin-Metabolismus ebenfalls für die erhöhte Blutdruckentwicklung verantwortlich ist. Kagiya *et al.* (1998) zeigten, dass es nach Injektion von L-Arginin oder einem NO-Donator in die rostrale ventrolaterale Medulla bei SHR ein stärkeres Absinken des Blutdruckes erreicht werden konnte, als es bei WKY-Ratten der Fall war. Auch auf intrazerebral applizierte NO-Synthase-Inhibitoren reagierten die SHR im Gegensatz zu den normotensiven Tieren mit einem geringeren Blutdruckanstieg, was auf eine geringere NOS-Aktivität im zerebralen kardiovaskulären Regulationszentrum hinweist (Dominiczak und Bohr, 1995). Auf Grund dieser pathophysiologischen Eigenschaften werden die SHR seit Jahren in der Forschung eingesetzt. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden diese Nager als Tiermodell verwendet.

3. Material und Methoden

3.1 Chemikalien, Materialien und Geräte

3.1.1 Chemikalien

Verwendete Chemikalien unter Angabe von Hersteller und Reinheit soweit im Text nicht anders vermerkt:

Chemikalie	Reinheitsgrad	Hersteller
Acetonitril	HPLC-grade	VWR International, Darmstadt
L-Alanin	> 90 %	Merck KGaA, Darmstadt
Alanyl-Prolin	> 99 %	Bachem, Weil am Rhein
Alcalase	$\geq 2,4$ U/g	Sigma-Aldrich, Seelze
Angiotensin- Converting-Enzyme	0,25 Units	Sigma-Aldrich, Seelze
Ammoniumacetat	p. a.	Fluka, Buchs, Schweiz
L-Arginin	> 90 %	Merck KGaA, Darmstadt
L-Asparaginsäure	> 90 %	Merck KGaA, Darmstadt
bidestilliertes Wasser		Hauseigene Destillationsanlage
Borsäure	reinst	VEB Jenapharm Laborchemie Apolda
Bovine Insulin	LMW Gel Filtrations Calibration Kit	Amersham Biosciences, Freiburg
Captopril	≥ 99 %	Fluka, Buchs, Schweiz
Collagenase Typ II	für Zellkulturzwecke	PAA laboratories GmbH, Pasching
L-Cystein	> 90 %	Merck KGaA, Darmstadt
Chymotrypsinogen	LMW Gel Filtrations Calibration Kit	Amersham Biosciences, Freiburg
CorolasePP		AB Enzymes, Darmstadt
Dansylchlorid	> 90 %	Fluka, Buchs, Schweiz
Dextran-Blau	LMW Gel Filtrations Calibration Kit	Amersham Biosciences, Freiburg
Dimethylsulfoxid	>99,8 %	Merck KGaA, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt
DTT (1,4-Dithiothreitol)	electrophoresis grade	ICN Biomedicals Inc., Frankfurt am Main
Endothelial Cell Growth Medium		Promo Cell, Heidelberg
Essigsäure	100 %; zur Analyse	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol	96 % (vergällt)	J. T. Baker, Deventer, Holland

Chemikalie	Reinheitsgrad	Hersteller
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)		Sigma-Aldrich, Seelze
Flavourzyme	≥ 500 U/g	Sigma-Aldrich, Seelze
Fötales Kälberserum (FCS)	Gold, hitzeinaktiviert	PAA laboratories GmbH, Pasching
Furosin		Synthese Arbeitskreis
Gelatine Type A from porcine skin		Sigma-Aldrich, Seelze
L-Glutaminsäure	> 99 %	Bachem, Weil am Rhein
Glycyl-Glycin	> 99 %	Bachem, Weil am Rhein
Glycin-Hydrochlorid	> 99 %	Bachem, Weil am Rhein
Glycyl-Isoleucin	> 99 %	Bachem, Weil am Rhein
Glycyl-Tyrosin	> 99 %	Bachem, Weil am Rhein
HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N-[2-ethanesulfonic acid])	mind. 99,5 %	Sigma-Aldrich, Seelze
HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N-[2-ethanesulfonic acid])	für Zellkulturzwecke	Sigma-Aldrich, Seelze
Hippursäure	≥ 97 %	Sigma-Aldrich, Seelze
Hippuryl-Histidyl-Leucin	> 99 %	Bachem, Weil am Rhein
Hippuryl-Lysin	> 99 %	Bachem, Weil am Rhein
L-Histidin	p.A.	Merck KGaA, Darmstadt
L-Isoleucin	p.A.	Merck KGaA, Darmstadt
Isoleucyl-Tryptophan	> 99 %	Bachem, Weil am Rhein
Kaliumdihydrogenphosphat	zur Analyse	Riedel-de Haën AG, Seelze
Kaliumsulfat	zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt
Kupfersulfat	zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt
α -Lactalbumin	> 90 % ≥ 95 %	Arla Foods, Düsseldorf Sigma-Aldrich, Seelze
β -Lactoglobulin	≥ 80 %	Sigma-Aldrich, Seelze
Lactose		Merck KGaA, Darmstadt
L-Leucin	p. A.	Merck KGaA, Darmstadt
Leucyl-Glycin	> 99 %	Bachem, Weil am Rhein
L-Lysin-Hydrochlorid	99,9 %	Calbiochem, Bad Soden
M-119	lyophilisiert	Gibco, Eggenstein
Methanol	HPLC-grade	VWR International, Darmstadt
Methylenblau		Merck KGaA, Darmstadt
Methylrot		Riedel-de Haën AG, Seelze

Chemikalie	Reinheitsgrad	Hersteller
Natriumcarbonat	p.A. wasserfrei	Laborchem. Apolda
Natriumchlorid	zur Analyse	Isocommerz, Dresden
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt
Natronlauge	32 %	VWR International, Darmstadt
Penicillin / Stryptocin	je 100 Units	Biochrom, Berlin
Pepsin	4230 u, 3300 u	Sigma-Aldrich, Seelze
Perchlorsäure	p. A.	Merck KGaA, Darmstadt
L-Phenylalanin	85 %	Serva Feinbiochemica Heidelberg
Phenylalanyl-Leucin	> 99 %	Sigma-Aldrich, Seelze
PMFS	> 99 %	Roth, Karlsruhe
L-Prolin	> 99 %	Bachem, Weil am Rhein
Pro-Thr-His-Ile-Lys-Trp-Gly-Asp	> 97 %	Sigma-Aldrich, Seelze
Phosphorsäure	85 %; zur Analyse	Säuren- und Basenlager der TU-Dresden
Reinstwasser		Hauseigene Entsalzungsanlage von Seraplus
Ribonuclease A	LMW Gel Filtrations Calibration Kit	Amersham Biosciences, Freiburg
Salzsäure	37 %	J. T. Baker, Deventer, Holland
Schwefelsäure	konzentriert	Säuren- und Basenlager der TU-Dresden
L-Serin	> 99 %	Bachem, Weil am Rhein
L-Threonin	> 99 %	Bachem, Weil am Rhein
Trypsin-EDTA	steril, für Zellkulturzwecke	Gibco, Eggenstein
Tyrosinyl-Alanin	> 99 %	Bachem, Weil am Rhein
Tyrosinyl-Valin	> 99 %	Bachem, Weil am Rhein
L-Tyrtophan	> 99 %	Bachem, Weil am Rhein
Tryptophanyl-Leucin	> 99 %	Bachem, Weil am Rhein
L-Tyrosin	p.A.	Sigma-Aldrich, Seelze
L-Valin	p.A.	Merck KGaA, Darmstadt
Valinyl-Tyrosin	> 99 %	Bachem, Weil am Rhein
Wasserstoffperoxid	30 %	Roth, Karlsruhe

3.1.2 Material und Geräte

Liste der verwendeten Materialien und Geräte sofern nicht an entsprechender Stelle detailliert beschrieben:

Gerät	Spezifikation	Hersteller
Aminosäureanalyse		
Analysator	LKB-Alpha Plus	Pharmacia-LKB, Freiburg
Detektor	UV	Pharmacia-LKB, Freiburg
Säule	PEEK, 125 x 4,6 mm; Porengröße 6 µm	Pharmacia-LKB, Freiburg
Software	Eurochrom 2000	Pharmacia-LKB, Freiburg
Analysenwaage	BP 121S und BP 3100S	Sartorius, Göttingen
Analytische HPLC I		
Analytische Säulen	Eurospher-100 C 18; 250 x 4,6 mm, Partikelgröße 5 µm	Knauer, Berlin
	Supersphere 100, RP 18 endcapped; 125 x 4,6 mm, Partikelgröße 4 µm	Knauer, Berlin
GPC Säulen	Superdex® Peptid HR 10/30	Pharmacia-LKB, Freiburg
Autosampler	Basic Marathon	Knauer, Berlin
Degasser		Knauer, Berlin
Dioden-Array-Detektor	WellChrom DAD K-2701	Knauer, Berlin
Dynamische Mischbox	K-5001	Knauer, Berlin
Fließmitteldosierer	Solvent Organizer K-1500	Knauer, Berlin
Pumpe	WellChrom HPLC PUMP K-1001	Knauer, Berlin
Säulenofen		Knauer, Berlin
Software	Eurochrom 2000	Knauer, Berlin
Analytische HPLC II		
Analytische Säulen	Eurospher-100 C 18; 250 x 4,6 mm, Packung 5 µm	Knauer, Berlin
	Supersphere 100, RP 18 endcapped; 125 x 4,6 mm, Partikelgröße 4 µm	Knauer, Berlin
Autosampler	A-900	
binäre	P-900	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Hochdruckpumpe		
Fluoreszenzdetektor	F-1050	Merck Hitachi, Darmstadt
UV-Detektor	UV-900	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Degasser	K-5004	Knauer, Berlin
Säulenofen	IWN CH 100	Jundedis-IWN Elektronik GmbH, Gröbenzell
Software	Unicorn 4.1	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Gefriertrocknungsanlage	ALPHA 1-2, BETA 1-8K	Christ Vacuubrand GmbH, Osterode
Inkubationsschrank	ICP 400	Memmert GmbH, Schwabach
Kjeldahl-Apparatur		
Aufschlussapparatur	Digestion Unit K-435	Büchi, Karlsruhe
	Scrubber B-414	
Ausflußkolben		Büchi, Karlsruhe
Destillationsapparatur	Destillation Unit B-324	Büchi, Karlsruhe
Titrierapparatur	728 Stirrer	Büchi, Karlsruhe
	775 Dosimat	

Gerät	Spezifikation	Hersteller
LC-ESI-TOF-MS		
Autosampler	1100 Series, G 1329A	Agilent Technologies, Waldbronn
Dioden-Array-Detektor	1100 Series, G 1315A	Agilent Technologies, Waldbronn
Ionisierungskammer	Mariner™ biospectrometry™ Workstation; ESI	Applied Biosystems, Stafford, USA
MS-Analysator	Mariner™ biospectrometry™ Workstation; TOF	Applied Biosystems, Stafford, USA
MS-Detektor	Mariner™ biospectrometry™ Workstation; Ionendetektor	Applied Biosystems, Stafford, USA
MS-Interface	Mariner™ biospectrometry™ Workstation; Quadrupol	Applied Biosystems, Stafford, USA
Pumpe	1100 Series, G 1313A, Binary Pump	Agilent Technologies, Waldbronn
Säule	Eurospher-100 C 18; 250 x 4,6 mm, Partikelgröße 5 µm	Knauer, Berlin
Säulenofen	1100 Series, G 1316A	Agilent Technologies, Waldbronn
Software	Biospectrometry Data Explorer™	Applied Biosystems, Stafford, USA
Magnetrührwerk	RTC basic	IKA Labortechnik, Staufen
Phasenkontrastmikroskop		Zeiss, Jena
pH-Messgerät	pH 526	Wissenschaftlich Technische Werkstätten, Weinheim
Präparative HPLC		
Degasser		Knauer, Berlin
Dynamische Mischbox	K-5001	Knauer, Berlin
Injektor		Knauer, Berlin
Fraktionssammler		Knauer, Berlin
Präparative Säule	Eurospher-100 C18, 205 x 16 mm, Partikelgröße 10 µm	Knauer, Berlin
Pumpe	WellChrom HPLC PUMP K-1001	Knauer, Berlin
Säulenofen		Knauer, Berlin
Software	Eurochrom 2000	Knauer, Berlin
UV-Detektor	WellChrom LAMP K-2501	Knauer, Berlin
Rotationsverdampfer	Laborota 4002	Heidolph, Schwabach
Trockenschrank	Modell 200	Memmert GmbH, Schwabach
Ultraschallbad	Transsonic 460	Elma, Singen
Vakuumzentrifuge		
Zentrifuge	SPD Speed Vac	Thermo Savant, Kehl
Kühlfalle	RVT 4104 Refrigerated Vapor Trap	Thermo Savant, Kehl
Vakuumpumpe	OFP-400	Thermo Savant, Kehl
Zentrifuge	Centrifuge 5804R	Eppendorf-Nethler-Hinz GmbH, Hamburg
	Biofuge pico, Heraeus Instruments,	Heraeus Instruments, Hanau

Verbrauchsmaterialien	Spezifikation	Hersteller
Eppendorf-Tubes	0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml	Eppendorf Nethler Hinz GmbH, Hamburg
Membranfilter	- RC-L-55, regenerierte Cellulose, Durchmesser 47 mm, Porengröße 0,45 µm, unsteril, - Spritzenvorsatzfilter SPARTAN 13/0,2 RC, regenerierte Cellulose, Durchmesser 13 mm, Porengröße 0,45 µm und 0,2 µm	Schleicher & Schüll, Dassel
Zellkulturflaschen	50 ml; 25 cm ²	Greiner, Solingen
Zellkulturplatten	35 ml; 9,6 cm ²	nunc, Wiesbaden

3.1.3 Untersuchungsmaterialien

Tabelle 3.1.3-1: Probennummer, Hersteller und der jeweilige Proteingehalt [g/100g Produkt] der analysierten hypoallergene Säuglingsnahrungen (HA1, für den Verzehr ab der Geburt)

Hypoallergene Säuglingsnahrungen (HA1 ab Geburt)	Hersteller	Proteingehalt [g/100g]
Probe 1	Alete	11,5
Probe 2	Beba	11,5
Probe 3 = HA3	Hipp	11,7
Probe 4	Humana	11,6
Probe 5	Milasan	11,5
Probe 6	Milumil, Milupa	11,4
Probe 7	Aptamil	11,4

Tabelle 3.1.3-2: Probennummer, Hersteller und der jeweilige Proteingehalt [g/100g Produkt] der analysierten hypoallergene Säuglingsnahrungen (HA2, für den Verzehr nach dem 4ten Monat)

Hypoallergene Säuglingsnahrungen (HA2 ab dem 6ten Monat)	Hersteller	Proteingehalt [g/100g]
Probe 8	Alete	13,4
Probe 9	Beba	13,4
Probe 10	Hipp	15,0
Hypoallergenen Säuglingsnahrungen (HA2 ab dem 6ten Monat)	Hersteller	Proteingehalt [g/100g]
Probe 11	Humana	10,9
Probe 12	Milasan	13,4
Probe 13	Milumil, Milupa	11,5

Tabelle 3.1.3-3: Probennummer, Hersteller und der jeweilige Proteingehalt [g/100g Produkt] der analysierten konventionellen Säuglingsnahrungen (für den Verzehr ab der Geburt)

Konventionelle Säuglingsnahrungen (KN ab der Geburt)	Hersteller	Proteingehalt [g/100g]
Probe 14	Alete	9,5
Probe 15	Beba	9,5
Probe 16 = KN3	Hipp	11,2
Probe 17	Humana	10,4
Probe 18	Milasan	11,9
Probe 19	Milumil, Milupa	10,7

Tabelle 3.1.3-4: Probenbezeichnung, Hersteller und der jeweilige Proteingehalt [g/100g Produkt] sonstiger Säuglingsnahrungen

Sonstige Säuglingsnahrungen	Hersteller	Proteingehalt [g/100g]
Konventionelle Säuglings-Folgenahrung (ab dem 8ten Monat)	Alete	9,5
Konventionelle Säuglings-Folgenahrung (ab dem 8ten Monat)	Beba	9,5
Konventionelle Säuglings-Folgenahrung (ab dem 8ten Monat)	Hipp	11,2
Gefriergetrocknete Humanmilchprobe 1	Anonyme Spende	
Gefriergetrocknete Humanmilchprobe 2	Anonyme Spende	
Gefriergetrocknete Humanmilchprobe 3	Spende von Dr. Sandra Merten	10,7 (nach Kjeldahl)

Tabelle 3.1.3-5: Probenbezeichnung, Hersteller und der jeweilige Proteingehalt [g/100g Produkt] sonstiger Proben

Sonstige Proben	Hersteller	Proteingehalt [g/100g]
Molkenproteinpulver Milei60	Milei	60
bovines α -Lactalbumin	Arla	≥ 90 %
humanes α -Lactalbumin	Sigma	≥ 99 %

Tabelle 3.1.3-6: Gegenüberstellung der Inhaltstoffe einer hypoallergenen Säuglingsnahrung (Probe 3 = HA 3) und einer konventionellen Nahrung (Probe 16 = KN3)

		HA 3 (= Probe 3)	KN 3 (= Probe 16)
	Einheit	Zusammensetzung pro 100 g Pulver	
Energie	kJ (kcal)	2130 (509)	2145 (513)
Eiweiß	g	11,7	11,2
Kohlenhydrate	g	54,9	57,3
davon Lactose	g	19,4	57,3
Glucose	g	2,2	
Maltose	g	4,7	
Polysaccharide	g	24	
Stärke	g	4,6	
Fett	g	27,0	26,5
davon gesättigte Fettsäuren	g	11,1	9,6
einfach ungesättigte Fettsäuren	g	11,7	10,8
mehrfach ungesättigte Fettsäuren	g	4,2	6,1
Ballaststoffe	g	0	0
Mineralstoffe			
Natrium	g	0,17	0,19
Kalium	mg	500	550
Calcium	mg	385	485
Magnesium	mg	46	45
Phosphor	mg	230	290
Chlorid	mg	300	350
Eisen	mg	4,6	5,7
Zink	mg	4,6	5,0
Kupfer	µg	345	200
Jod	µg	54	70
Vitamine			
Vitamin A	µg	445	540
Vitamin B1	mg	0,34	0,7
Vitamin B2	mg	0,7	1,8
Vitamin B6	mg	0,3	0,44
Panthothensäure	mg	1,7	5
Folsäure	µg	80	60
Niacin	mg	5,9	7
Vitamin B12	µg	1,0	1,0
Vitamin C	mg	65	100
Vitamin D	µg	9,3	9
Vitamin E	mg	10	7,5
Biotin	µg	8,5	25
Vitamin K	µg	38	30
Inositol	mg	115	
Carnitin	mg	12	
Cholin	mg	60	
Taurin	mg	35	

3.2 Probenaufarbeitung

3.2.1 Entrahmung

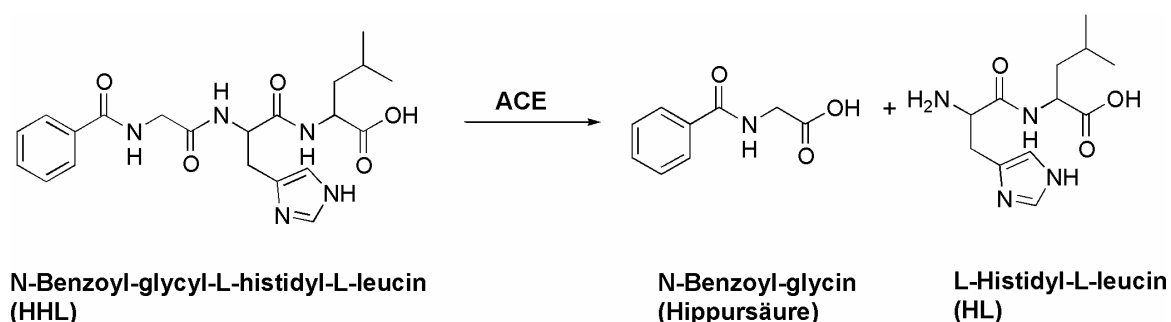
Jeweils 1 g Probe (Milchpulver) werden in 10 ml Reinstwasser gelöst und bei 9000 U/min 20 min zentrifugieren. Mittels nachfolgender Filtration wird das aufgerahmte Fett entfernt. Anschließend wird der Zentrifugationsrückstand wieder mit 10 ml Reinstwasser aufgeschlämmt, nochmals 20 min bei 9000 U/min zentrifugiert und abermals filtriert. Schließlich werden die gesammelten Filtrate gefriergetrocknet und für die weiteren Untersuchungen genutzt.

3.2.2 Proteinfällung mit Acetonitril

Die Fällung wird mit einer ca. 70%igen wässrigen Acetonitril-Lösung durchgeführt. Dazu werden 100 mg der nach 3.2.1 entrahmten, gefriergetrockneten Probe in 2 ml Reinstwasser gelöst und anschließend mit 5 ml vorgekühltem Acetonitril versetzt. Für eine vollständige Fällung wird der Ansatz über Nacht im Kühlschrank bei 5 °C gelagert. Die Abtrennung des Niederschlags erfolgt durch Filtration. Das im Filtrat enthaltene Acetonitril wird am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 30-40°C und Druck von 200 mbar entfernt und anschließend der wässrige Rückstand gefriergetrocknet.

3.3. Bestimmung der ACE-Aktivität

Die Bestimmung der ACE-Aktivität erfolgt anlehnend an einen von *Cushman und Cheung (1979)* beschriebenen Enzym-Test. Wie in Abbildung 3.3-1 dargestellt, katalysiert ACE die Hydrolyse zu L-Histidyl-L-leucin (HL) und N-Benzoyl-glycin (Hippursäure).



Die UV-aktive ($\lambda_{\max}=228$ nm) Hippursäure kann mittels RP-HPLC quantifiziert werden. Durch Zugabe eines ACE-Inhibitors wird weniger Hippursäure gebildet. Folglich kann mit Hilfe einer Konzentrationsreihe der jeweiligen Inhibitorlösung die Inhibitorkonzentration ermittelt werden, die zur Senkung der ACE-Aktivität um die Hälfte nötig ist (IC_{50}).

Im Folgenden sind die benötigten Reagenzien sowie der Ablauf des Aktivitäts-Tests beschrieben:

Puffer:	50 mM HEPES + 300 mM Natriumchlorid (pH 8,3 bei 37 °C) 2,383 g HEPES und 3,506 g NaCl in 190 ml Reinstwasser lösen, auf 37 °C erwärmen, pH-Wert der Lösung mit NaOH auf 8,3 einstellen, mit Reinstwasser auf 200 ml auffüllen
Substrat:	5 mM Hip-His-Leu in HEPES-Puffer
Enzym:	ACE-Lösung 0,25 U in 4 ml bidest. Wasser lösen
Salzsäure:	1N 8,3 ml 37%ige HCl mit Reinstwasser auf 100 ml auffüllen

Alle Proben werden in bidest. Wasser gelöst. Für die Bestimmung der IC_{50} –Werte der HANahrungen wird als Anfangskonzentration 100 mg der vorbehandelten Probe in 1 ml bidest. Wasser gelöst und entsprechend verdünnt. Für alle weiteren Untersuchungen werden im nachfolgenden die eingesetzten Probenmengen gesondert angegeben. Tabelle 3.3-1 zeigt die Durchführung des ACE-Aktivitätstests. In jeder Messreihe wurden zwei Enzym-Blindwerte mitgeführt, in denen an Stelle von Probenlösung das gleiche Volumen bidest. Wasser zugegeben wurde. Der Blindwert entspricht einer 100%igen ACE-Aktivität. Die Berechnung der IC_{50} -Werte erfolgte über das Softwareprogramm SigmaPlot 5.0.

Tabelle 3.3-1: Durchführung des ACE-Aktivitätstests

	Blindwert	Probe
Substratzugabe (HHL)	100 µl	
Zugabe der Probelösung	25 µl bidest. Wasser	25 µl Probelösung
Temperieren des Ansatzes	10 min bei 37 °C	
Enzymzugabe	20 µl ACE-Lösung (1,25 mU)	
Inkubation	2 h bei 37 °C	
Abstoppen der Reaktion	125 µl 1 N HCl	

Nachfolgend sind die RP-HPLC-Parameter zur Quantifizierung der Hippursäure sowie die für die Kalibrierung benötigte Stammlösung mit entsprechenden Verdünnungen aufgelistet:

Stammlösung: 1 mM Hippursäurelösung :
17,92 mg Hippursäure in Reinstwasser lösen und anschließend 100 ml auffüllen. Kalibrierlösungen: 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1 mM durch Verdünnen mit Reinstwasser

Säule: Supersphere 100, RP 18 endcapped; 125 x 4,6 mm,
Partikelgröße 4 µm

Injektionsvolumen: 20 µl

Säulentemperatur: 25 °C

Flussrate: 1,0 ml / min

Detektion: UV: 228 nm

Elutionssystem:

Eluent A: 100 % Methanol (HPLC grade), entgast

Eluent B: 10 mM Kaliumdihydrogenphosphatlösung (pH 3,0)
1,3609 g KH_2PO_4 in 800 ml Reinstwasser lösen, pH-Wert der Lösung mit H_3PO_4 auf 3,0 einstellen, mit Reinstwasser auf 1 l auffüllen, membranfiltrieren

Gradient:

Tabelle 3.3-2: Gradientenparameter zur Bestimmung der Hippursäuregehalte mittels RP-HPLC

Zeit [min]	A [%]
0	15
5	40
7	80
9	80
10	15
11	15

Für die Bestimmung der IC_{50} -Werte der Säuglingsnahrungen (vgl. Kapitel 4.1) werden jeweils 0,1 g Probe eingewogen. Diese werden in 1 ml bidest. Wasser gelöst und 1:2; 1:5; 1:10; 1:2; 1:50; 1:100; 1:200 ebenfalls mit bidest. Wasser verdünnt, bevor die jeweilige Konzentration zur Bestimmung der ACE-Aktivität eingesetzt wird. Nach Bestimmung des

Umsatzes zu Hippursäure, kann der IC_{50} mittels SigmaPlot 5.0 berechnet werden, indem die ACE-Aktivität gegen die entsprechende Konzentration an Testlösung aufgetragen wurde. Eine typische Konzentrations-Aktivitätskurve ist in Abbildung 3.3-1 zu sehen.

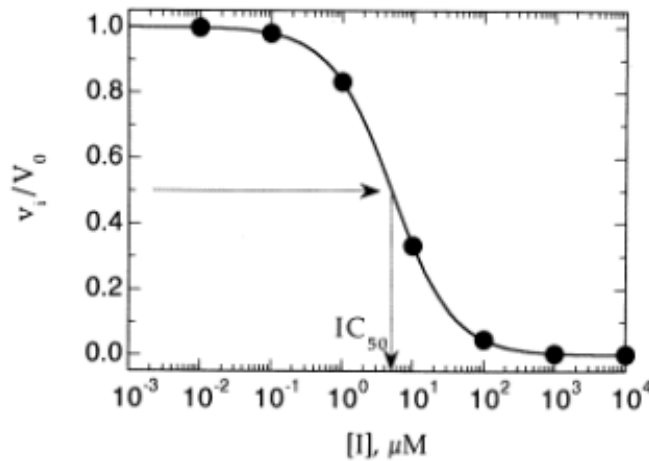


Abbildung 3.3-1: Konzentrations- Aktivitäts - Kurve für eine Enzym-Inhibitor-Reaktion zur Bestimmung des IC_{50} -Wertes (Copeland, 1996)

Die Enzymaktivität (y-Achse) wird gegen die Inhibitorkonzentration (x-Achse) aufgetragen. Als Berechnungsgrundlage zur Bestimmung der 50% Aktivitätshemmung wird die Standard-Drei-Parameter nicht lineare Regressions-Analyse (vgl. Funktion in Abbildung 3.3-2) des Softwareprogramms SigmaPlot 5.0 genutzt.

$$y = \frac{a}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}} \right)^b}$$

Abbildung 3.3-2: Standard-3-Parameter nicht lineare Regressions-Analyse

3.4 Analyse der Peptidverteilung in den hypoallergen Säuglingsnahrungen mittels Umkehrphasen-Hochleistungsflussigkeitschromatografie (RP-HPLC)

Zur Aufklärung der unterschiedlichen Inhibierungspotentiale der hypoallergen Säuglingsnahrungen, wird unter anderem in Anlehnung an eine von *Partschefeld (2004)* entwickelte Methode eine Analyse der Peptide mittels RP-HPLC durchgeführt. Die anschließende UV-Detektion erfolgt zum einen bei einer Wellenlänge von 220 nm, bei der unter anderem Peptidbindungen absorbieren, und zum anderen bei 280 nm, wo aromatische

Verbindungen, wie die Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin sowie Tryptophan detektierbar sind. Zum Vergleich der Proben untereinander wird diese einer einheitlichen Probenaufarbeitung (siehe Kapitel 3.2) unterzogen, wobei die Proben auch ungefällt untersucht werden. Es wird jeweils die gleiche Konzentration von 10 mg Proben in 1 ml bidest. Wasser gelöst, gewählt. Die entsprechenden Parameter sowie der Gradient der RP-HPLC-Messungen sind nachfolgend zusammengefasst.

Säule: Eurospher 100 – C18, 250 x 4,6 mm; Partikelgröße 5µm

Einspritzvolumen: 20 µl

Säulentemperatur: 35 °C

Flussrate: 0,7 ml / min

Detektion: UV (DAD): 220 sowie 280 nm

Elutionssystem:

Eluent A: 10 mM Ammoniumacetatpuffer (pH 5,5)

0,77 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ in 800 ml Reinstwasser lösen, den pH-Wert der Lösung mit 3 %iger CH_3COOH auf 5,5 einstellen, mit Reinstwasser auf 1,0 l auffüllen, membranfiltrieren

Eluent B: 84 % Acetonitril + 16 % 10 mM Ammoniumacetat

840 ml Acetonitril mit 160 ml Reinstwasser, welches 0,77 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ und die gleiche Menge CH_3COOH wie Fließmittel A enthält, versetzen, membranfiltrieren und entgasen

Gradient:

Tabelle 3.4-1: Gradientenparameter zur Bestimmung der Peptidverteilung mittels RP-HPLC

Zeit [min]	A [%]
0	100
2	100
17	75
35	50
41	5
44	0
49	0
53	100
60	100

3.5 Analyse der Molmassenverteilung mittels Gelpermeationschromatographie (GPC)

Die Proben werden zum Zweck der Vergleichbarkeit der Enthraumung nach 3.2 unterzogen sowie in gleichen Konzentrationen von 10 mg Probe in 1 ml bidest. Wasser gelöst zur Analyse eingesetzt. Die Detektion der eluierenden Substanzen erfolgt in Analogie zu Kapitel 3.4 bei 220 und 280 nm. Die zur Durchführung verwendeten Chemikalien sowie Parameter sind im Folgenden aufgezeigt.

Säule:	Superdex Peptide HR 10/30
Einspritzvolumen:	20 µl
Säulentemperatur:	Raumtemperatur
Detektion:	UV (DAD): 220 und 280 nm
Fließmittel:	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung: 10 mM Phosphat + 300 mM Natriumchlorid (pH 7,4) 1,47 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (8,28 mM), 0,23 g KH_2PO_4 (1,72 mM), 17,53 g NaCl (300 mM) und 0,20 g KCl (2,7 mM) in 800 ml Reinstwasser lösen, mit Reinstwasser auf 1,0 l auffüllen, membranfiltrieren (der pH-Wert der Lösung beträgt automatisch 7,4 und muss daher nicht eingestellt werden)
Flussrate:	0,5 ml/min
Elutionssystem:	isokratisch; 70 min

Tabelle. 3.5-1: Konzentration [mg/ml] und Molmassen [Da] der Standardsubstanzen für die Kalibrierung der Gel-Permeationschromatographie Untersuchungen

Standardsubstanz	Molmasse [Da]	Konzentration [mg/ml]
Gly-Tyr	238,3	0,34
Tyr-Val	280,3	0,34
Hip-Lys	307,0	0,25
Hip-His-Leu	429,0	0,50
Bradykinin	1060,2	0,71
Neurotensin	1672,9	0,50
Bovine Insulin ^a	5733	5,00
Ribonuclease A ^a	13700	0,80
Chymotrypsinogen ^a	25000	0,60
Dextran-Blau ^a	1000000	1,00

^a) aus LMW Gel Filtrations Calibration Kit von Amersham Biosciences

Für die Molmassenkalibrierung werden die in Tabelle 3.5.-1 aufgelistete Substanzen verwendet. Die Ausschlussgrenze wird mit Dextran-Blau bestimmt.

Zur Gewährleistung einer guten chromatographischen Trennung und zur Erhöhung der Haltbarkeit der GPC-Säule, wird nach ca. 30 Analysen bzw. einem Druckanstieg über 13 bar die in Tabelle 3.5-2 zusammengefasste Säulenregenerierung durchgeführt.

Tab. 3.5-2: Parameter für die Regenerierung der GPC-Säule

Substanz	Säulenvolumen	Fluss [ml/min]
Natronlauge (0,5 N)	1-2	0,5
Isopropanol (20 %ig)	2-3	0,5

Zwischen den einzelnen Schritten wird mit mindestens einem Säulenvolumen Reinstwasser gespült. Es ist darauf zu achten, dass vor der Elution mit Isopropanol ein neutraler pH-Wert der Säule erreicht wird. Um den Degasser sowie Detektor vor einer möglichen Korrosion zu schützen, müssen beide während der Säulenregenerierung aus dem RP-HPLC-System ausgekoppelt werden.

3.6 Identifizierung ACE-hemmender Verbindungen in Probe 3

Die Identifizierung ACE-inhibierender Peptide in den hypoallergen Sänglingsnahrungen erfolgte am Beispiel der Probe 3. Anhand der Bestimmung der Molmassen mittels LC-ESI-TOF-MS werden Peptidmassen ermittelt aus vorhergehenden Analysen unter Verwendung des Softwareprogramm Biospectrometry Data ExplorerTM (MarinerTM; Applied Biosystems Stafford, USA) bestimmt.

Die verwendeten Parameter werden im Folgenden angegeben:

Säule: Eurospher-100 C 18; 250 x 4,6 mm, Partikelgröße 5 µm
Einspritzvolumen: 50 µl
Säulentemperatur: 35 °C
Flussrate: 0,7 ml / min
Ionisierung: positiv Modus
Detektion: UV (λ = 220 und 280 nm) und MS

Elutionssystem:

- Eluent A: Acetonitril/ 5 mM Ammoniumacetatpuffer (pH 5,5) 84 + 16 (v/v)
840 ml Acetonitril (HPLC grade) mit 160 ml Fließmittel B mischen,
membranfiltrieren und entgasen
- Eluent B: 5 mM Ammoniumacetatpuffer (pH 5,5)
0,385 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ in 800 ml Reinstwasser lösen, pH-Wert der
Lösung mit 3 %iger Essigsäure auf 5,5 einstellen, mit Reinstwasser auf
1 l auffüllen, membranfiltrieren

Gradient:

Tabelle 3.6-1: Parameter der Gradientenelution der LC-ESI-TOF-MS-Untersuchungen

Zeit [min]	A [%]
0	5
10	5
14	8
23	45
29	69
44	80
48	80
50	5
57	5

3.7 Fraktionierung von Probe 3 mittels semipräparativer RP-HPLC

Zur Identifizierung besonders potenter ACE-Inhibitoren werden die Inhaltsstoffe einer HA-Nahrung (Probe 3) nach Polarität in mehrere Fraktionen unterteilt. Für die präparative Trennung wird die HA-Nahrung zunächst nach Kapitel 3.2 aufgearbeitet und anschließend in Reinstwasser gelöst, so dass eine Konzentration von 150 mg/ml vorliegt. Die Parameter der Fraktionierung sind im Folgenden aufgeführt.

- Säule: Eurospher 100 – C18, 250 x 16 mm; Partikelgröße 10 μm
- Einspritzvolumen: 900 μl
- Säulentemperatur: 35 $^{\circ}\text{C}$
- Detektion: UV: 220 nm

Elutionssystem:

- Eluent A: Acetonitril/ 0,1 %ige Trifluoressigsäure 60 + 40 (v/v)
0,4 ml Trifluoressigsäure in 400 ml Reinstwasser lösen, Lösung mit 600 ml Acetonitril (HPLC grade) mischen, membranfiltrieren und entgasen
- Eluent B: 0,11 %ige Trifluoressigsäure
1,1 ml Trifluoressigsäure in Reinstwasser lösen, mit Reinstwasser auf 1 l auffüllen, membranfiltrieren

Gradient:

Tabelle 3.7-1: Gradientenparameter zur Fraktionierung der Probe 3 mittels semi-präparativer RP-HPLC

Zeit [min]	A [%]	Fluss [ml/min]
0	0	4,5
6	0	4,0
15	20	4,0
33	60	4,0
51	100	4,5
59	0	4,5
64	0	4,0
65	0	0,059

Abbildung 3.7-1 zeigt das mit den beschriebenen Gradientenparametern erhaltenen Chromatogramm einschließlich der gewählten Schnittstellen für die einzelnen Fraktionen.

Alle erhaltenen Fraktionen werden am Rotationsverdampfer eingeeengt. Dabei wird die Temperatur des Wasserbades bei 30-35°C gehalten und ein Vakuum von zunächst 200 mbar gewählt. Wird kein Lösungsmittel mehr abrotiert, wird das Vakuum stufenweise bis zu einem Enddruck von 80-50 mbar abgesenkt. Anschließend wird der Rückstand gefriergetrocknet.

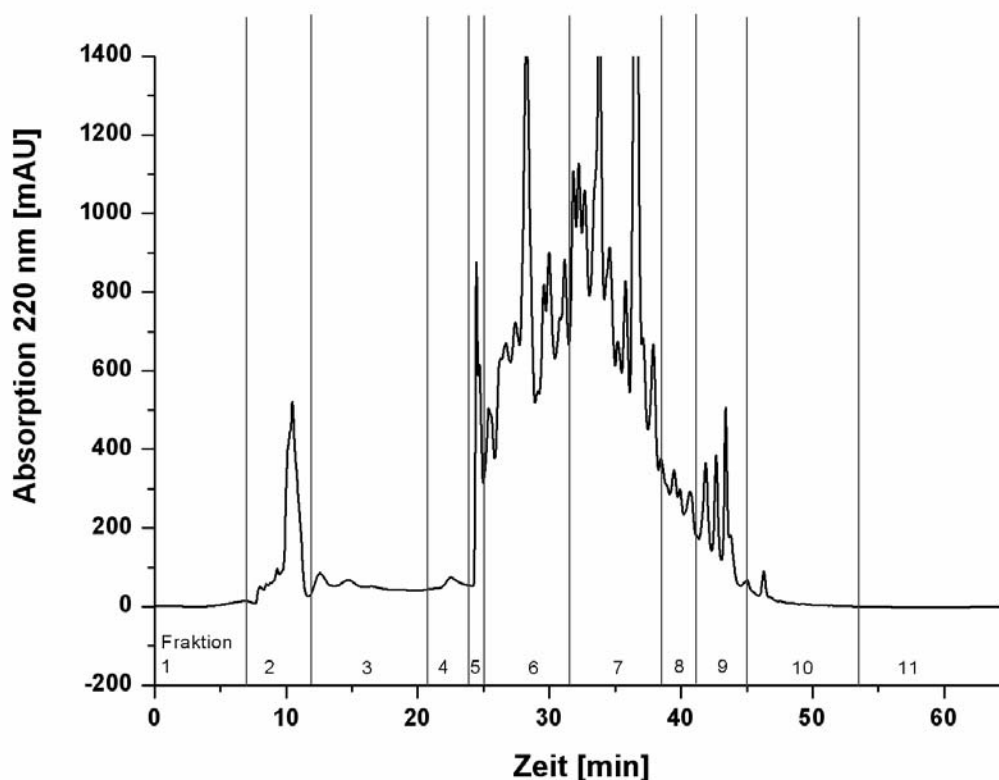


Abbildung 3.7-1: Semi-präparatives RP-HPLC-Chromatogramm der Probe 3 mit den gewählten Fraktionierungsschnittstellen; Detektion $\lambda = 220$ nm

3.7.1 Weiterführende Auftrennung der Fraktion 9 (Probe 3)

Für die weitere Auftrennung wurde Fraktion 9 in einer Konzentration von 5 mg/ml eingesetzt. Die semi-präparativen RP-HPLC-Parameter sind nachfolgend dargestellt.

Säule: Eurospher-100 C18, 250 x 16 mm; Partikelgröße 10 μ m

Einspritzvolumen: 600 μ l

Säulentemperatur: 35 °C

Detektion: UV: 220 nm

Elutionssystem:

Eluent A: Acetonitril/ 5 mM Ammoniumacetatpuffer (pH 5,5) 84 + 16 (v/v)
840 ml Acetonitril (HPLC grade) mit 160 ml Fließmittel B mischen,
membranfiltrieren und entgasen

Eluent B: 5 mM Ammoniumacetatpuffer (pH 5,5)
 0,385 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ in 800 ml Reinstwasser lösen, pH-Wert der
 Lösung mit 3 %iger Essigsäure auf 5,5 einstellen, mit Reinstwasser auf
 1 l auffüllen, membranfiltrieren

Gradient:

Tabelle 3.7.1-1: Gradientenparameter zur Fraktionierung von Fraktion 9 mittels semi-präparativer RP-HPLC

Zeit [min]	A [%]	Fluss [ml/min]
0	19	4,0
2	10	4,0
15	23	4,0
16,5	23	4,0
18	25	4,0
19,5	25	4,0
21	26	4,0
22,5	26	4,0
24	28	4,0
25,5	28	4,0
42	50	4,0
44	95	4,0
47	100	4,0
50	100	4,0
53	19	4,0
57	19	4,0

Abbildung 3.7.1-1 zeigt das Peptidchromatogramm der Fraktion 9 mit Schnittstellen.

Alle erhaltenen Unterfraktionen werden anschließend am Rotationsverdampfer (Temperatur: 30-35°C; Druck: 200-50 mbar) eingeeengt und gefriergetrocknet.

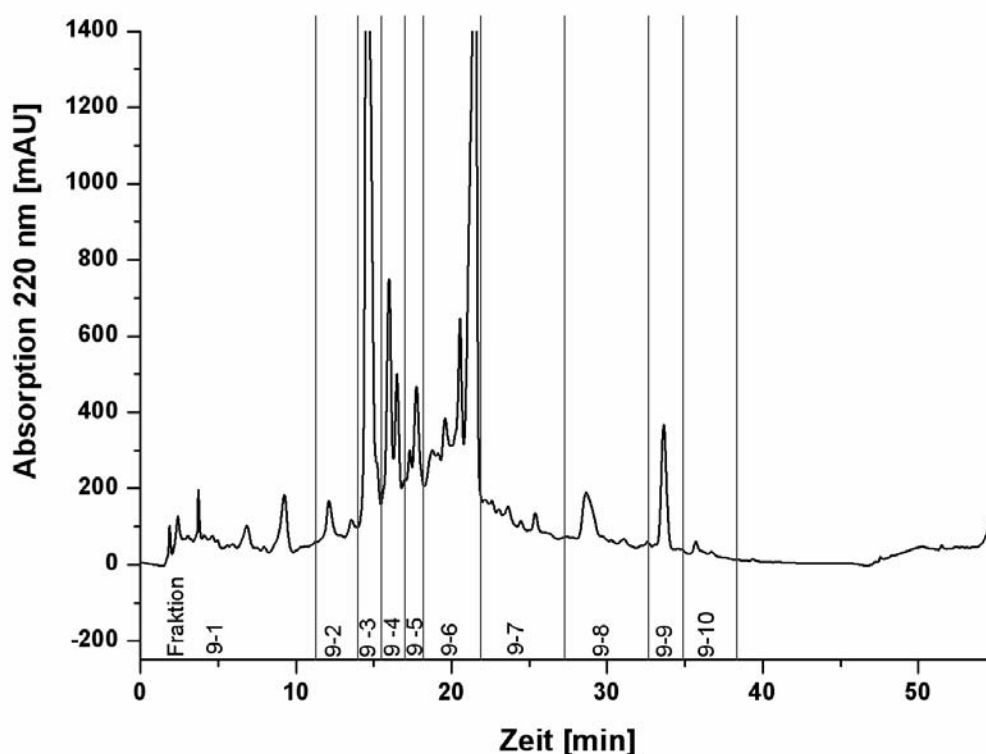


Abbildung 3.7.1-1: Semi-präparatives RP-HPLC-Chromatogramm der Fraktion 9 mit Schnittstellen, Detektion $\lambda = 220$ nm

3.7.2 Bestimmung der Molmassen in Unterfraktion 9-3 mittels LC-ESI-TOF-MS

Zur Bestimmung der Molmassen individueller Peptide werden die Unterfraktionen mittels RP-HPLC mit anschließender Detektion im UV bei 220 und 280 nm sowie hochauflösender ESI-TOF-Massenspektrometrie untersucht. Aus den ermittelten Molmassen können mit dem Programm Data ExplorerTM (MarinerTM; Applied Biosystems Stafford, USA) die möglichen Aminosäurezusammensetzungen bestimmt werden. Für diese Analysenmethode werden die Unterfraktion in einem Methanol-Wasser-Gemisch (80:20) in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst und membranfiltriert. Die Parameter werden analog Kapitel 3.6 verwendet.

Gradient: Es wird der Gradient, der auch für die weitere Auftrennung der Fraktion 9 genutzt wird, verwendet (vgl. Kapitel 3.7.1).

3.7.3 Identifizierung der N-terminalen Aminosäuren im Peptidverband

Zur Bestimmung der Sequenz der Aminosäuren im Peptid werden die α -Amino- sowie Iminogruppen der Peptide im alkalischen Medium mit Dansylchlorid derivatisiert (Abbildung 3.7.3-1). Die fluoreszierenden Dansyl-Peptide werden durch anschließende Säurehydrolyse gespalten, wodurch die säurestabilen N-terminalen Dansyl-Aminosäuren freigesetzt werden. Mittels RP-HPLC und Detektion bei 254 nm können diese aufgetrennt und identifiziert werden. Für die Derivatisierung werden je 10 mg Probe in 1 ml Methanol-Wasser-Gemisch (80:20) gelöst. 100 μ l dieser Lösung werden mit 100 μ l 80 mM Na_2CO_3 -Lösung (848 mg in 100 ml Reinstwasser) und 100 μ l Dansylchlorid-Lösung (150 mg in 100 ml Acetonitril) versetzt, 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend schnell abgekühlt. Von jeder Fraktion werden drei Ansätze hergestellt, wobei ein Ansatz unhydrolysiert zur RP-HPLC-Untersuchung eingesetzt wird. Die anderen beiden werden nach Entfernung des Acetonitrils und des Methanols im Stickstoffstrom mit 120 μ l 12 N HCl versetzt und bei 110 °C 2 bzw. 17 h lang hydrolysiert. Anschließend werden die Hydrolysate in der Vakuumzentrifuge bis zur Trockne abrotiert, die Rückstände in 100 μ l Reinstwasser gelöst und membranfiltriert. Zur Identifizierung der Dansyl-Aminosäuren in den Unterfraktionen (Fraktion 9, Probe 3) werden jeweils ein Aminosäurestandard sowie ein Gemisch aller Aminosäuren, wie beschrieben derivatisiert. Asparagin und Glutamin sind bei diesen Untersuchungen nicht berücksichtigt, da diese während der Säurehydrolyse zu Asparagin- bzw. Glutaminsäure reagieren. Die Säurestabilität der Dansyl-Aminosäuren wird durch 17-stündige Säurehydrolyse bei 110 °C überprüft. Die verwendeten HPLC-Parameter sind im Folgenden aufgelistet.

Säule:	Eurospher-100 C 18; 250 x 4,6 mm, Partikelgröße 5 μ m
Einspritzvolumen:	20 μ l
Säulentemperatur:	30 °C
Flussrate:	0,7 ml / min
Elutionssystem:	
Eluent A:	Methanol mit 0,15 % Phosphorsäure 1,765 ml H_3PO_4 in 1 l Methanol (HPLC grade) lösen, membranfiltrieren und entgasen
Eluent B:	0,15 % Phosphorsäure 1,765 ml H_3PO_4 in 1 l Reinstwasser lösen, membranfiltrieren

Gradient:

Tabelle 3.7.3-1: Gradient zur chromatographischen Trennung der Dansyl-Aminosäuren

Zeit [min]	A [%]
0	3
4	3
20	42
22	42
28	56
32	56
50	100
53	100
56	3
59	3

3.8 Bestimmung des Gesamtstickstoffgehalts nach Kjeldahl

Die für die Durchführung benötigten Chemikalien sind im Folgenden aufgeführt.

Schwefelsäure: konzentriert

Katalysatorgemisch: 3 Teile Titandioxid + 3 Teile Kupfersulfat + 100 Teile Kaliumsulfat

Natronlauge: 32 %ig
als fertige Lösung erworben

Schwefelsäure: 0,1 N
eine Ampulle Schwefelsäure auf 1,0 l mit Reinstwasser auffüllen

Borsäure: 2 %ig
20 g H_3BO_3 werden in Reinstwasser gelöst, auf 1,0 l mit Reinstwasser auffüllen

Indikator: 100 ml einer Lösung von 0,03 % Methylrot in 70 Vol.-%igem Ethanol werden mit 15 ml einer 0,1 %igen wässrigen Methylenblau-Lösung gemischt

Es werden von den entrahmten, gefällten und gefriergetrockneten HA-Nahrungen (Probe 1-7), sowie der gefriergetrockneten und entrahmten und gefriergetrockneten Muttermilchprobe 3 jeweils ca. 150 mg in einen Aufschlusskolben eingewogen und mit einer kleinen Spatelspitze

des Katalysatorgemisches sowie 20 ml konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Die Lösungen werden in der Aufschlussapparatur langsam erhitzt und so lange am schwachen Sieden gehalten, bis der Aufschluss klar ist. Nach Abkühlen werden die Proben jeweils mit 20 ml Reinstwasser verdünnt und mit wenigen Tropfen des Tashiro-Indikator-Gemisches versetzt. Anschließend wird mittels Destillationsapparatur (Büchi) sowie unter Zusatz von 30 ml Reinstwasser und 50 ml Natronlauge unter Wasserdampf in eine Vorlage, die mit 50 ml Borsäure sowie wenigen Tropfen des Tashiro-Indikator-Gemisches versehen ist, destilliert. Das erhaltene Wasserdampfdestillat wird mit 0,1 N Schwefelsäure-Maßlösung rücktitriert. Zur Überprüfung der Richtigkeit der Methode wird eine Wiederfindung mit trockenem Ammoniumsulfat durchgeführt. Dadurch wird der Gehalt an Gesamtstickstoff ermittelt. Dabei entspricht 1 ml Säure (0,1N) 1,4008 mg Stickstoff. Zur Berechnung des Proteingehaltes wird, da die Proben zu den Milchprodukten zählen, der Stickstoffgehalt mit dem Faktor 6,38 multipliziert.

3.9 Quantifizierung ACE-inhibierender Peptide in Probe 3

Die Quantifizierung identifizierter ACE-inhibierender Peptide erfolgt mit Hilfe von Standardpeptiden und RP-HPLC mit anschließender UV- bzw. Fluoreszenzdetektion. Quantifiziert werden die Dipeptide GY, VY, IW und WL. Dabei können die tryptophanhaltigen Peptide neben UV-Detektion auch über Fluoreszenzdetektion quantifiziert werden. Über Standardpeptide wird eine externe Kalibrierung durchgeführt über die schließlich auf die Gehalte in den Produkten geschlossen wird. Nachfolgend sind zunächst die RP-HPLC Parameter für die Quantifizierung der beiden Dipeptide GY und VY dargestellt.

Säule:	Eurospher-100 C 18; 250 x 4,6 mm, Porengröße 5 µm
Einspritzvolumen:	20 µl
Säulentemperatur:	30 °C
Flussrate:	0,6 ml / min
Detektion:	UV: λ = 220 nm und 280 nm
Elutionssystem:	
Elution A:	Acetonitril/10 mM Ammoniumacetat (pH 5.5) 84 + 16 (v/v) 840 ml Acetonitril mit 840 ml Acetonitril (HPLC grade) mit 160 ml Fließmittel B mischen, membranfiltrieren und entgasen

Elution B: 5 mM Ammoniumacetatpuffer (pH 5,5)
 0,385 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ in 800 ml Reinstwasser lösen, pH-Wert der
 Lösung mit 3 %iger Essigsäure auf 5,5 einstellen, mit Reinstwasser auf
 1 l auffüllen, membranfiltrieren

Gradient:

Tabelle 3.9-1: Gradient zur Quantifizierung der Dipeptide GY und VY

Zeit [min]	A [%]
0	0
2	0
11	15
25	50
40	75
41	100
49	100
53	0
60	0

Es wird jeweils eine acht Punkt Kalibration durchgeführt. Der Konzentrationsbereich liegt dabei für GY bei 2 μM - 2 mM bzw. für VY bei 1 μM - 1 mM.

Die tryptophanhaltigen Dipeptide IW, WI, LW und WL werden nach Auftrennung mittels RP-HPLC im UV bei 220 und 280 nm sowie anschließender Fluoreszenz ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 355 \text{ nm}$) detektiert. Nachfolgend sind auch hier die RP-HPLC Parameter zur Quantifizierung der beiden Peptide dargestellt.

Säule: Eurospher-100 C 18; 250 x 4,6 mm, Partikelgröße 5 μm

Einspritzvolumen: 20 μl

Säulentemperatur: 30 $^{\circ}\text{C}$

Flussrate: 0,7 ml / min

Elutionssystem:

Eluent A: Methanol mit 0,15 % Phosphorsäure
 1,765 ml H_3PO_4 in 1 l Methanol (HPLC grade) lösen,
 membranfiltrieren und entgasen

Eluent B: 0,15 % Phosphorsäure
 1,765 ml H_3PO_4 in 1 l Reinstwasser lösen, membranfiltrieren

Gradient:

Tabelle 3.9-2: Gradient zur Quantifizierung der Dipeptide IW und WL

Zeit [min]	A [%]
0	3
4	3
20	42
22	42
28	56
32	56
50	100
53	100
56	3
59	3

Es erfolgt jeweils eine acht Punkt Kalibration. Der Konzentrationsbereich liegt dabei für IW und WL bei 1 µM - 1 mM.

3.10 Charakterisierung der enzymatische Hydrolyse des Molkenproteinpulvers Milei60 nach Patent EP 1 063 873

3.10.1 Enzymatische Hydrolyse

Die enzymatische Hydrolyse des Molkenproteins Milei60 wird in Anlehnung an das Patent EP 1 063 873 A1 8 (*Bindels et al., 2000*) durchgeführt. Dabei dienen als proteolytisch wirkende Enzyme das aus dem Schweinepankreas gewonnene Trypsin (EC 3.4.21.4), sowie zwei weitere Proteasen, die Alcalase® (*Bacillus licheniformis*) und Flavourzyme (*Aspergillus oryzae*). Die Enzyme werden für diese Studien 1:10 verdünnt eingesetzt. Tabelle 3.10.1-1 stellt die Durchführung der Hydrolyse dar.

Tabelle 3.10.1-1: Durchführung der enzymatischen Hydrolyse des Molkenproteinpulvers Milei60

	Molkenproteinlösung Milei60 10g/50 ml bidest. Wasser
Einstellung pH-Wert mit 3 N NaOH	pH = 7,0
Zugabe Enzym	Trypsin: 0,0015 g (2,338 U) Alcalase: 200 µl (0,07 U) Flavourzyme: (7,5 U)
Inkubation	10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 30 h, 48 h 55°C im Wasserbad
Abkühlung	< 10°C innerhalb von 10 min
Inaktivierung	Erhitzung bei 100°C für 10 min im Trockenschrank

3.10.2 Bestimmung des Hydrolyseverlaufs mittels GPC

Für die Bestimmung der Molmassenverteilung und damit dem Grad der Hydrolyse der unterschiedlich lang inkubierten Proben wird die Gelpermeationschromatographie (GPC) als Analysenmethode gewählt. Die Ermittlung der Molmassen erfolgt anschließend durch den Vergleich mit Standards. Kalibriert wird im Bereich von 89,1 Da (Alanin) bis 25,0 kDa (Chymotrypsinogen). Zur Bestimmung der Ausschlussgrenze dient Dextran-Blau. Auf Grund der Unterschiede im Absorptionsvermögen werden verschiedene Konzentrationen der Standardsubstanzen verwendet. Nachfolgend sind die für die Kalibrierung nötigen Standardsubstanzen sowie ihre Molmassen und für die Chromatographie verwendete Konzentrationen und Elutionszeiten tabellarisch zusammengefasst.

Tabelle 3.10.2-1: Zur GPC-Kalibrierung verwendetet Standardsubstanzen mit entsprechenden Molmassen [Da], Elutionszeiten [min] und eingesetzten Konzentrationen [mg/ml]

Standard	Molmasse [Da]	Konzentration [mg/ml]	Elutionszeit [min]
Dextran-Blau	1000000	1,0	14,2
Chymotrypsinogen	25000	0,6	16,2
Ribonuclease A	13700	0,8	17,5
Bovine Insulin	5733	5,0	20,1
PTHIKWGD	953,07	2,0	30,6
LG	188,23	2,0	32,2
GG	132,12	2,0	33,3
L	131,18	4,0	33,1
A	89,09	4,0	33,3

Zur Bestimmung des Hydrolysegrades wird für alle Proben eine einheitliche Proteinkonzentration von 20 mg/ml Ansatz verwendet. Die weiteren GPC-Parameter sind in Kapitel 3.5 beschrieben.

Zur Identifizierung einzelner Peptide und Aminosäuren wurden weitere Standardverbindungen eingesetzt. Diese sind mit ihren Molmassen, Elutionszeiten und den Konzentrationen in Tabelle 3.10.2-2 aufgelistet.

Tabelle 3.10.2-2: Peptid- und Aminosäurestandards mit entsprechenden Molmassen [Da], Elutionszeiten [min] und eingesetzten Konzentrationen [mg/ml]

Standard	Molmasse [Da]	Konzentration [mg/ml]	Elutionszeit [min]
GF	222,22	2,0	35,4
VY	213,29	2,0	35,2
FV	264,32	2,0	33,6
WL	317,39	2,0	45,5
IW	317,39	2,0	42,5
F	165,19	1,0	37,1
Y	181,19	1,0	39,4
W	204,23	1,0	53,1

3.10.3 Bestimmung des ACE-inhibierenden Effekts der Proteinhydrolysate

Die Bestimmung des ACE-inhibierenden Effektes erfolgt wie in Kapitel 3.3. beschrieben. Neben den unterschiedlich lang inkubierten Proben wird auch eine Blindwertprobe analysiert, die alle verwendeten Enzyme und das Molkenproteinpulver in gleicher Konzentration wie die Hydrolyseproben enthält. Allerdings wird nach Zugabe aller Substanzen sofort die enzymatische Wirkung durch eine 10minutige Inkubation bei 100°C inaktiviert. Ebenso werden eventuelle Effekte auf das ACE durch die Einzelverbindungen getestet. Dafür werden die Enzyme inaktiviert und einzeln auf eine mögliche ACE-Hemmung untersucht. Ebenso wird mit dem Molkenproteinpulver verfahren, allerdings wird dies auch nicht thermisch behandelt auf eine inhibierende Wirkung hin untersucht. Für die Bestimmung des IC₅₀-Wertes der Hydrolyseproben werden mehrere Konzentrationen in dem ACE-Aktivitätstest eingesetzt. Ausgegangen wird von einer Proteinkonzentration von 1000 mg Protein/l. Die Stammlösung wird 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100 verdünnt und alle Lösungen hinsichtlich ihres ACE-hemmendes Effektes untersucht. Zur Auswertung wird auch hier mit SigmaPlot 5.0 gearbeitet (vgl. Kapitel 3.3).

3.11 Untersuchungen zum Einfluss der Lagerung auf die ACE-Hemmung

Drei hypoallergene Säuglingsnahrungen (Probe 1, 2 und 3) werden bei 4°C, Raumtemperatur, sowie bei 37°C für 14 Monate gelagert und anschließend der Gehalt der α -N-(2-Furoylmethyl)-aminosäuren (FMAAs) bestimmt, sowie der Einfluss auf den ACE-inhibierenden Effekt untersucht. Des Weiteren werden Inkubationsversuche für die Probe 3 bei 80°C für 0, 10 und 30 Minuten sowie 1, 2, 3, 5, 8, 12, 24 und 48 Stunden durchgeführt.

3.11.1 Quantifizierung der α -N-(2-Furoylmethyl)-aminosäuren

Als Grundlage für die Bestimmung dient eine am Institut etablierte Methode (*Penndorf et al., 2007*). Durch Säurehydrolyse werden die FMAAs aus den entsprechenden *Amadori*-Produkten freigesetzt. Auf Grund der unterschiedlichen Polaritäten können die Substanzen mittels RP-HPLC an einer C18-Säule aufgetrennt werden. Detektiert wird bei einer Wellenlänge von 280 nm.

3.11.1.1 Säurehydrolyse

0,1 g Probenmaterial werden mit 1,2 ml 7,95 N HCl in Hydrolyseröhrchen 23 h bei 110 °C im Sandbad erhitzt, wobei nach 1 h nochmals geschüttelt wird. Nach der 23stündigen Hydrolyse und Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Suspensionen in 2 ml Eppendorf-Tubes überführt und in der Vakuumzentrifuge zur Trockne eingengt. Die verwendeten Röhrchen werden zur quantitativen Überführung des kompletten Hydrolysematerials 2mal mit 200 μ l 7,95 N HCl gespült und diese erneut im Vakuum getrocknet.

Der komplette Rückstand wird in 500 μ l 0,2 N HCl im Ultraschallbad suspendiert und nach Zentrifugation (10 000 rpm, 15 min) über Membranfilter (0,45 μ m) filtriert.

Die so erhaltene Lösung wird direkt zur RP-HPLC eingesetzt oder für spätere Bestimmungen bei -18 °C gelagert. Im Folgenden sind die verwendeten Reagenzien dargestellt.

- | | |
|-----------|---|
| Salzsäure | 7,95 N |
| - | 66,2 ml 37 %ige HCl mit Reinstwasser auf 100 ml auffüllen |
| | 0,2 N |
| - | 1,66 ml 37 %ige HCl mit Reinstwasser auf 100 ml auffüllen |

3.11.1.2 RP-HPLC-Parameter zur Quantifizierung der FMAAs

Säule: Eurospher-100 C 18; 250 x 4,6 mm, Partikelgröße 5 µm
 Injektionsvolumen: 50 µl (Autosampler)
 Säulentemperatur: 25 °C
 Detektion: UV (DAD): $\lambda = 280$ nm
 Flussrate: 0,7 ml / min
 Elutionssystem:
 Eluent A: Methanol 2% FA:
 20,0 ml Ameisensäure mit Methanol (HPLC grade) auf 1 l auffüllen,
 membranfiltrieren und entgasen
 Eluent B: Reinstwasser 2% FA:
 20,0 ml Ameisensäure mit Reinstwasser auf 1 l auffüllen,
 membranfiltrieren

Gradient:

Tabelle 3.12.1.2-1: Parameter der Gradientenelution zur Quantifizierung der FMAAs mittels RP-HPLC

Zeit [min]	A [%]
0	0
10	0
15	6
34	6
61	15
65	80
68	80
70	0
80	0

Die Peakzuordnung erfolgt über Retentionszeitenvergleich mit Standardsubstanzen. Quantifiziert werden die FMAAs über eine externe Kalibration mittels Furosinstandard. (Penndorf *et al.*, 2007).

3.11.2 Bestimmung der ACE-Aktivität

Zur Bestimmung der inhibierenden Wirkung wird der ACE-Aktivitätstest wie in Kapitel 3.3 beschrieben, durchgeführt. Die bei 4°C, Raumtemperatur und 37°C gelagerten Proben werden in einer Proteinkonzentration von 100 mg/l eingesetzt. Für die Bestimmung des IC₅₀-Wertes der bei 80°C inkubierten Probe 3 werden die gleiche Konzentration und die gleichen Verdünnungen wie für die IC₅₀-Wert Bestimmung der HA-Nahrung in Kapitel 3.3 verwendet.

3.12 Inkubation ausgewählter Peptide mit Lactose

Ausgewählte Einzelpeptide sowie Mischungen dieser werden zusammen mit Lactose für fünf bzw. acht Stunden bei 80 °C erhitzt (vgl. Tabelle 3.12-1).

Tabelle 3.12-1: Einzelpeptide und Mischungen für Inkubation mit Lactose

IW	Isoleucyl-Tryptophan
WL	Tryptophyl-Leucin
VY	Valyl-Tyrosin
GY	Glycyl-Tyrosin
LGG	Leucyl-Glycyl-Glycin
FV	Phenylalanyl-Valin
LG	Leucyl-Glycin
LW	Leucyl-Tryptophan
YV	Tyrosyl-Valin

Für die Inkubationen wird das durchschnittliche Masseverhältnis Protein/Kohlenhydrat aller getesteten Säuglingsnahrungen berücksichtigt und daher für die Inkubationen ein Verhältnis Peptid bzw. Mischung: Lactose 1:5 (w/w) gewählt. Zur homogenen Verteilung aller Komponenten wird eine wässrige Lösung aus 25 mg Peptid und 125 mg Lactose hergestellt und diese nach Zugabe von 50 mg mikrokristalliner Cellulose in Hydrolyseröhrchen gefriergetrocknet. Die so erhaltenen Proben werden 5 bzw. 8 Stunden im Sandbad bei 80°C trocken erhitzt und nach Abkühlung auf Raumtemperatur in einem definierten Volumen bidestilliertem Wasser gelöst. Die Cellulose wird mittels Filtration entfernt. Die Inkubationslösungen dienen als Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen die nachfolgend beschrieben werden.

3.12.1 Quantifizierung der α -N-(2-Furoylmethyl)-aminosäuren

Die Quantifizierung der FMAAs verläuft analog 3.11.1.

3.12.2 Bestimmung des ACE-hemmenden Effektes

Die Inkubationsansätze werden wie in Kapitel 3.3 beschrieben hinsichtlich ihres ACE-inhibierenden Effektes untersucht. Tabelle 3.12.2-1 zeigt die verwendeten Konzentrationen auf den Peptidgehalt der Proben bezogen.

Tabelle 3.12.2-1 Einsatzkonzentrationen für ACE-Aktivitätstest – Inkubation mit Lactose

Peptid	Konzentration der Lösung	
	[mg/l]	[μ M]
IW	42	132
WL	42	132
LW	42	132
VY	625	2232
GY	625	2626
LGG	1000	4082
FV	1000	3788
LG	1000	5319
YV	1000	3571

3.13 Simulierte gastrointestinale Verdauung

Die Vorgänge des Gastrointestinal-Traktes werden am Beispiel von zwei Säuglingsnahrungen simuliert. Die Durchführung erfolgt mittels einem *in vitro* Test-Verfahren, welcher auch Grundlage der Untersuchungen von *Hernandez-Ledesma et al. (2004)* ist. Für die Durchführung der simulierten Verdauung werden wässrige Lösungen der Säuglingsnahrungen Probe 3 (= HA3) und Probe 16 (= KN3) verwendet. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Proteingehalte (vgl. Kapitel 3.1.3) werden 0,7%ige Proteinlösungen der jeweiligen Nahrung hergestellt. Des Weiteren wird eine humane Muttermilchprobe sowie die Peptide WL, IW und LW dem simulierten Verdau unterzogen. Für diese Proben werden eine Protein- bzw. Peptidkonzentration von 1 g / l für die simulierte Verdauung hergestellt. Der Proteingehalt der humanen Muttermilch wird wie im Kapitel 3.9 beschrieben mittels Kjeldahlverfahren zu 1,16g / 100 ml bestimmt. Die Lösungen werden alle mit 1N HCl auf einem pH-Wert von 4,3 eingestellt und zentrifugiert (20 min, 10 000 rpm). Dadurch wird nach Filtration über Faltenfilter eine fettfreie Emulsion erhalten (im Folgenden wässriger Extrakt = WSE). Nachfolgend ist der Ablauf sowie die verwendeten Chemikalien für den simulierten Verdau dargestellt.

Pepsinlösung: 68 ku / g Protein

- 11,25 mg Pepsin (4230 U/mg Enzym) in 1 ml bidestilliertem Wasser lösen, davon 100 µl für 10 ml WSE (Säuglingsnahrung Probe 3 und 16)
- 2,1 mg Pepsin (3300 U/mg Enzym) in 1 ml bidestilliertem Wasser lösen, davon 10 µl für 1 mg Protein (Muttermilch und Peptidlösungen)

CorolasePP: 28,3 u / g Protein

- 28 mg CorolasePP (0,71 u/mg Enzym)¹ in 1 ml bidestilliertem Wasser lösen, davon 100 µl für 10 ml WSE (Säuglingsnahrung Probe 3 und 16)
- 4 mg CorolasePP in 1 ml bidestilliertem Wasser lösen, davon 10 µl für 1 mg Protein (Muttermilch und Peptidlösungen)

Natronlauge: 1 N

- 40 g NaOH mit Reinstwasser auf 100 ml auffüllen

Salzsäure: 1 N

- 8,3 ml 37 %ige HCl mit Reinstwasser auf 100 ml auffüllen

3.13.1 Durchführung der simulierten gastrointestinalen Verdauung

Die Durchführung der simulierten Verdauung ist in Abbildung 3.13.1-1 schematisch dargestellt. Zur Untersuchung der einzelnen Verdauungsabschnitte werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben entnommen und die Enzyme bei 95°C im Sandbad für 10 Minuten inaktiviert.

Die inaktivierten Probenlösungen werden jeweils zentrifugiert (20 min, 10 000 rpm) und der Überstand für weitere Untersuchungen eingesetzt.

¹ Persönliche Mitteilung Hellwig; 2007

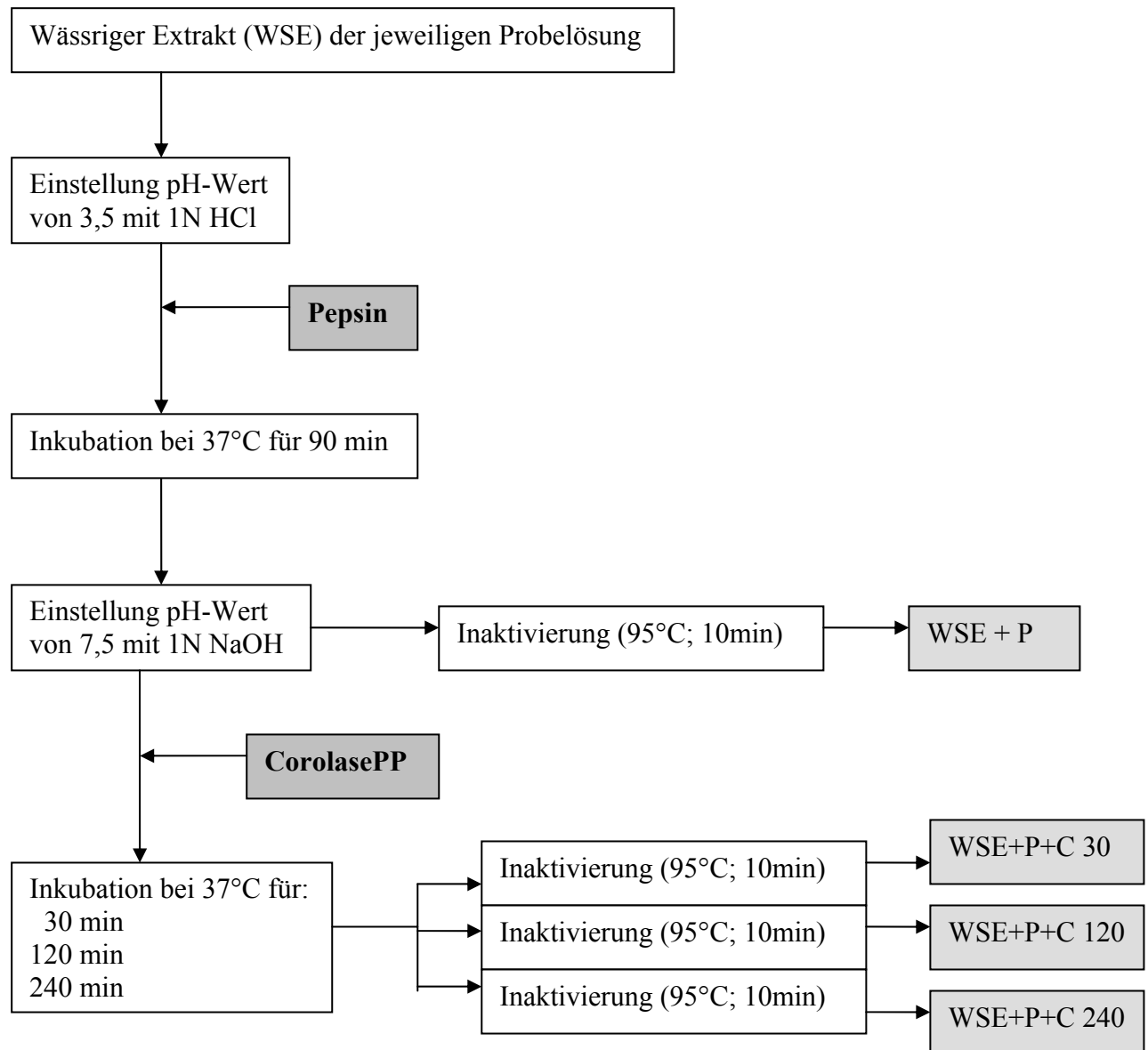


Abbildung 3.13.1-1 Durchführungsschema der simulierten Verdauung

3.13.2 Bestimmung des ACE-hemmenden Effekts

Die der simulierten Verdauung unterworfenen Proben werden wie in Kapitel 3.3 beschrieben hinsichtlich ihres ACE-inhibierenden Effektes untersucht. Tabelle 3.13.2-1 zeigt die verwendeten Konzentrationen auf den Peptidgehalt der Proben bezogen. Für die Konzentration der Peptide wird die Verdünnung durch Zugabe der Enzyme jeweils miteinbezogen. Dies geschieht bei den Milchproben nicht, da bei den relativ hohen Proteinkonzentrationen die Auswirkungen dieser Verdünnungen minimal sind.

Tabelle 3.13.2-1: verwendete Proteinkonzentrationen für den ACE-Aktivitätstest

Peptid	Proteinkonzentration im Enzymansatz
HA3	130 mg/l (sowie 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 Verdünnungen)
KN3	2600 mg/l (sowie 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 Verdünnungen)
Humanmilchprobe 3	93 mg/l
WSE (WL, IW, LW)	0,30 mg/l
WSE + P (WL, IW, LW)	0,25 mg/l
WSE + P+C (WL, IW, LW)	0,24 mg/l

3.13.3 Bestimmung der Molmassenverteilung mittels Gel-Permeationschromatographie

Die Bestimmung der Molmassenverteilung mittels GPC erfolgt analog Kapitel 3.5, nur das Einspritzvolumen ist für die Säuglingsnahrung sowie der Humanmilchprobe 3 mit 50 µl höher als das für die Einzelpeptide, für die nur 20 µl zur Untersuchung eingesetzt werden. Die Proben werden vor und am Ende der simulierten gastrointestinalen Verdauung analysiert, sowie auch die Molmassenverteilung für die Zwischenstufen der Proteolyse bestimmt wird. Dabei werden für die Säuglingsnahrungen Proteinkonzentrationen von 0,7 g/l eingesetzt. Für die Muttermilchproben und die Einzelpeptide 1 g/l bzw. 0,1 g/l.

3.14 ACE-Aktivitätsbestimmung *ex vivo* an humanen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC)

Die Zellkulturexperimente werden mit humanen Nabelschnur-Venen-Endothelzellen (HUVEC) durchgeführt. Die Isolierung wie auch Kultivierung dieser Zellen erfolgt nach einer von Pexa (2006) im Rahmen ihrer Dissertation etablierten Methode.

3.14.1 Isolierung und Kultivierung der Humanen Nabelschnur-Venen-Endothelzellen (HUVEC)

Nachfolgend sind die verwendeten Chemikalien und Lösungen zur Isolierung und Kultivierung der HUVECs angegeben.

PBS (phosphate buffered saline):

137,1 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 12,1 mM Na_2HPO_4 ; 1,5 mM KH_2PO_4 in entionisiertem Wasser lösen und anschließend autoklavieren.

Kulturmedium M 199:

Das in lyophilisierter Form erhältliche Fertigmedium wird in entionisiertem Wasser gelöst (9,5 g/l) und mit 2,2 g NaHCO_3 /l versetzt. Auf Grund des thermolabilen Fertigmediums wird die Lösung sterilfiltriert und anschließend mit 10% FCS, 1% Rinderaugenwachstumsfaktor und 1% Penicillin Streptomycin (100 Units) versetzt. Die fertige Lösung wird sterilfiltriert.

Kulturmedium Vascular Endothelial Cell Growth Medium :

Das Fertigmedium liegt steril verpackt in flüssiger Form vor. Benötigte Zusätze wie Serum und Wachstumsfaktoren werden separat geliefert und vor Gebrauch zugegeben. Bevor das Medium eingesetzt wird, werden unter sterilen Bedingungen jeweils 1% Penicillin und 1% Streptomycin (je 100 Units) zugesetzt.

Kulturmedium DMEM :

Auch hier liegt das Fertigmedium flüssig und steril vor. 10 % FCS, und 1 % Penicillin/Streptomycin (100 Units) werden kurz vor Gebrauch unter sterilen Bedingungen zugegeben.

Inkubationspuffer HUVEC:

140 mmol/l NaCl; 4 mmol/l KCl; 1,8 mmol/l CaCl_2 ; 2,2 mmol/l MgSO_4 ; 0,48 mmol/l NaH_2PO_4 ; 2 mmol/l Pyruvat; 5,5 mmol/l D(+)-Glucose und 10 mmol/l HEPES werden in entionisiertem Wasser gelöst und mit 8 N NaOH auf pH = 7,4 eingestellt. Die hergestellte Lösung wird autoklaviert.

Präparation und Kultivierung von HUVEC

Die Zellen werden innerhalb eines Zeitrahmens von 24 Stunden nach der Geburt aus der humanen Nabelschnur isoliert. Unter sterilen Bedingungen wird die Nabelschnur zunächst gereinigt und mit 70%igen Ethanol desinfiziert. Nach mehrmaligen Spülen mit Phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) wird die Vena umbilicalis mit Hilfe einer Knopfkanüle mit Kollagenase II (0,5% in PBS) befüllt und mit Nadelhaltern verschlossen. Die eingesetzte Menge an Kollagenaselösung liegt zwischen 15 - 30 ml. Das Volumen wird

dabei jeweils der Länge der Nabelschnur angepasst. Nach Inkubation bei 37°C können die Endothelzellen durch vorsichtiges Klopfen von der Gefäßwand abgelöst werden. Zum Abstoppen der Protease-Reaktion werden 10 ml kaltes Kulturmedium M199 zu der erhaltenen Zellsuspension aus der Nabelschnur gegeben. Für das Befüllen mit Kollagenase und Abstoppen der Reaktion soll ein Zeitrahmen von 15 Minuten eingehalten werden, um Zellschädigungen und vermehrtes Ablösen von Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten zu vermeiden. Nach Zentrifugation bei 4 °C und 1200 U/min für 5 Minuten werden die Zellen sedimentiert. Nachdem der kollagenasehaltige Überstand vorsichtig abgenommen wird, kann das Zellpellet in Kulturmedium M199 resuspendiert werden. Für die Anzucht dieser Primärkultur dienen Zellkulturflaschen (Bodenfläche 25cm²), die mit einer 0,5%igen Gelatine-Lösung bei 37°C 15 min beschichtet werden. Bevor das resuspendierte Zellpellet zugegeben wird, werden die Flaschen mit 4 ml M199 bei 37°C bis zum Erreichen dieser Temperatur vorgewärmt. Die Kultur aus Erythrozyten, Endothelzellen und eventuell vorhandenen Fibroblasten oder glatten Muskelzellen wird zunächst über 24 Stunden bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% im Brutschrank inkubiert. Mittels einer gründlichen Spülung mit PBS kann der Hauptanteil von Erythrozyten abgetrennt werden. Die nachfolgende Kultivierung im Endothelial Cell Growth Medium selektierte durch den Zusatz spezieller Wachstumsfaktoren zwischen Endothelzellen und Fibroblasten bzw. glatten Muskelzellen. Die Primärkulturen werden unter täglicher Kontrolle mittels Phasenkontrastmikroskop auf Kontaminationen bis zur Konfluenz vermehrt. Als konfluente Zellschicht wird ein dicht zusammenhängender und einschichtiger Zellrasen mit engem Zellkontakt angesehen. Für die Bestimmung der *ex vivo* ACE-Aktivität werden die Zellen auf Zellkulturplatten (Durchmesser 35 mm) ausgesät. Nach Aspirieren des Zellmediums wird mit PBS gespült, damit werden die im Medium enthaltenen Trypsin-Inhibitoren entfernt. Nach Zugabe von 1 ml Trypsin-EDTA und Inkubation bei 37 °C für eine Minute werden die Zellen von der Gelatineschicht gelockert. Bevor sich die Zellen endgültig ablösen, runden sich die zuvor lang gestreckten Zellen ab. Dies wird unter dem Phasenkontrastmikroskop verfolgt und das Trypsin sofort durch Umdrehen der Zellkulturflasche und anschließendes Aspirieren entfernt, sobald alle Zellen eine kugelige Form haben. Damit kann eine vollständige Ablösung der Zellen sowie eine Trypsin-induzierte Schädigung vermieden werden. Durch kräftiges Klopfen wird erreicht, dass sich die Zellen komplett von der Gelatineschicht ablösen. Diese werden anschließend in Endothelial Cell Growth Medium resuspendiert. Die resultierende Zellsuspension wird gleichmäßig auf die gelatinierten Zellkulturplatten verteilt und die Platten, analog wie oben beschrieben, bis zur Konfluenz gezüchtet. Jede Zellkultur wird vor

Durchführung der Analysen unter dem Mikroskop betrachtet und hinsichtlich Morphologie, Zelldichte, Anzahl toter Zellen und mikrobiologischen Kontaminationen beurteilt und gegebenenfalls verworfen.

3.14.1 Vorversuche

Zur Bestimmung *ex vivo* ACE-Aktivität an HUVEC wird das gleiche Substrat wie auch in dem *in vitro* Verfahren genutzt. Die benötigte HHL-Konzentration wird nach der K_m -Wert-Bestimmung festgelegt. Für diese Untersuchung werden unterschiedliche Substratkonzentrationen (6 mM, 3 mM, 1,5 mM, 0,6 mM, 0,3 mM und 0,15 mM), gelöst im Zellpuffer PBS, eingesetzt und der Umsatz von HHL zu Hippursäure und His-Leu durch die katalytische Wirkung des ACE mittels RP-HPLC (Parameter analog Kapitel 3.3) bestimmt. Bevor die Substratlösung auf die Zellen gegeben werden kann, wird die Nährlösung unter sterilen Bedingungen abgesaugt und die Zellenplatten dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend werden jeweils 5 ml der entsprechenden Substratlösung auf die Zellen gegeben und diese wieder bei 37°C unter vorsichtigem Schütteln inkubiert. Die Inkubationszeit wird nach 24ständiger Aufnahme der katalytischen Wirkung des ACE zu 4 h, 5 h und 6 h gewählt. Für diese Analyse wird eine fünffache Bestimmung gewählt, wobei jeweils Zellen aus unterschiedlichen Nabelschnüren isoliert werden. Die K_m -Wert-Bestimmung erfolgt, wie auch die anschließenden IC_{50} -Wert-Bestimmungen über das Auswerteprogramm SigmaPlot 5.0 (vgl. Kapitel 3.3).

Des Weiteren ist es nötig zu untersuchen, inwieweit sich die verwendeten Chemikalien auf die Vitalität der Zellen auswirkten. Dafür werden die einzelnen Chemikalien, wie auch getestete Inhibitorverbindungen in den höchsten verwendeten Konzentration (Gesamt volumen jeweils 5 ml) zu den Zellen gegeben und über 4 h, 5 h, 6 h, 7 h und 8 h bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend die Vitalität der Zellen mittels Trypan-Blau-Färbung bestimmt. Dafür werden die Zellen mittels Trypsin-EDTA abgelöst, 5 min bei 900 rpm abzentrifugiert und das serumhaltige Medium vorsichtig abgesaugt. Die Zellen werden anschließend im PBS-Puffer resuspendiert. Zum Auszählen der lebenden bzw. toten Zellen wird ein Hämozytometer (Neubauer Zählkammer) verwendet. Die Kammer wird mit einem Deckglas versehen, wenn die so genannten Newton'schen Ringe erscheinen, ist das Deckglas richtig angebracht. 20 µl der Zellsuspension werden mit 80 µl 0,5%iger Trypanblaulösung versehen und bei Raumtemperatur für exakt zwei Minuten inkubiert. Danach werden die

Zellen nochmals resuspendiert und 20 µl der angefärbten Suspension in die Zählkammer, bis zur vollständigen Füllung gegeben. Es ist darauf zu achten, dass ein Über- bzw. Unterfüllen vermieden wird. Bevor mit der Auszählung begonnen wird, wird ein bis zwei Minuten gewartet, damit sich alle Zellen absetzen. Die Auszählung erfolgt mikroskopisch mit einer 10-40fachen Vergrößerung. Es wird die Gesamtzahl der Zellen, sowie die Anzahl der toten, welche blau gefärbt sind, bestimmt. Die Zählkammer besteht aus neun Quadraten, welche je ein Volumen von 0,1 µl fassen.

3.14.2 Durchführung des ACE-Aktivitätstest an HUVEC

Wie schon oben erwähnt wird als Substrat für das ACE in den Endothelzellen das synthetische peptidanalogue HHL gewählt das auch in den *in vitro*-Verfahren eingesetzt wurde. Dadurch ist es auch hier möglich, die Aktivität des ACE über den Gehalt an Hippursäure zu definieren. Der Ablauf des Testsystems ist in Tabelle 3.14.2-1 dargestellt.

Tabelle 3.14.2-1: Durchführung des ACE-Aktivitätstests

	Blindwert	Probe
Zellenvorbereitung	Absaugen des Nährmedium und anschließend 3maliges Waschen mit PBS	
Zugabe des Substrats mit Probelösung	5 ml HHL (1,5 mM)	5 ml Lösung aus HHL (1,5 mM) und jeweilige Testsubstanz
Inkubation	4 h, 5 h, 6 h bei 37 °C	
Bestimmung ACE-Aktivität	Abnahme aliquoter Volumina nach der jeweiligen Inkubationszeit und Quantifizierung des Hippursäure mittels RP-HPLC analog 3.3	

Es werden für alle Analysen nur konfluente Zellen (in der Regel nach 3-5 Tagen) verwendet und es wird unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Das Substrat wird im Zellpuffer PBS gelöst und die Probesubstanzen in der Substratlösung. Auch in dem *ex-vivo*-Verfahren wird ein Blindwert mitgeführt, der der 100%igen ACE-Aktivität entspricht. Bei diesem wird nur Substratlösung zu den Zellen gegeben. Da pro Kultivierung sechs Platten vorliegen, können jeweils fünf verschiedene Probenkonzentrationen eingesetzt werden. Bei der Auswahl der Konzentrationen wird sich zunächst auf in bekannte *in vitro* Hemmwirkungen berufen. Wird eine bessere bzw. schlechtere Inhibierung festgestellt, werden die Konzentrationen dementsprechend angepasst, so dass eine korrekte IC₅₀-Wert-Bestimmung durchgeführt werden kann. Nach der jeweiligen Inkubationszeit werden aliquote Teile (1 ml) der Substrat- bzw. Substrat-Proben-Lösung abgenommen und direkt für die Quantifizierung der

Hippursäure mittels RP-HPLC eingesetzt. Vor dem Einspritzen der Probe werden diese zentrifugiert (10 min, 10 000 rpm), damit sich eventuell enthaltenen Zellbestandteile absetzen. Der Überstand wird schließlich für die RP-HPLC-Untersuchungen genutzt. Der ACE-Aktivitätstest muss nicht abgestoppt werden, da das Enzym an der Oberfläche der Endothellzellen gebunden vorliegt. Die Ermittlung der IC₅₀-Werte erfolgt auch hier mittels SigmaPlot 5.0 (vgl. Kapitel 3.3). In Tabelle 3.14.2-2 sind die jeweiligen Testsubstanzen mit der Stammkonzentration und weiteren Verdünnungen dargestellt. Des Weiteren werden alle unten angegebenen Testsubstanzen (jeweils mit der 5 bzw. 10fach erhöhten und der jeweiligen Stammkonzentration) ohne Substratzusatz zu den Zellen gegeben und 4 h, 5 h, 6 h und 7 h inkubiert und anschließend mittels RP-HPLC (Parameter analog 3.3) hinsichtlich eines proteolytischen Abbaus untersucht. Für alle Analysen wird mindestens eine fünffach Bestimmung durchgeführt.

Tabelle 3.14.2-2: Für die ACE-Hemmung *ex-vivo* eingesetzte Testsubstanzen mit der jeweiligen Stammkonzentration und entsprechenden Verdünnungen

Testsubstanz	Stammkonzentration	Verdünnungen
Captopril	109 nM	1:2; 1:4; 1:20; 1:100
Pro-Thr-His-Ile-Lys-Trp-Gly-Asp (PTHIKWGD)	12,6 µM	1:2; 1:10; 1:20; 1:100
Tyr-Ala (YA)	1400 µM	1:2; 1:5; 1:10; 1:20
Phe-Val (FV)	1000 µM	1:2; 1:5; 1:10; 1:20
Val-His (VH)	1030 µM	1:2; 1:5; 1:10; 1:20
Val-Trp (VW)	240 µM	1:2; 1:4; 1:10; 1:20
Tyr-Val (YV)	1090 µM	1:2; 1:5; 1:10; 1:20
Val-Tyr (VY)	102 µM	1:2; 1:4; 1:10; 1:20
Gly-Tyr (GY)	805 µM	1:2; 1:4; 1:10; 1:20
Ile-Trp (IW)	12,4 µM	1:2; 1:5; 1:10; 1:20
HA3	220 mg Protein/l	1:2; 1:5; 1:10; 1:20

3.15 Fütterungsstudie an spontan hypertensiven Ratten (SHR)

Zur Beurteilung möglicher hypotensiver Effekte durch die Aufnahme von HA-Nahrung werden Fütterungsstudien an spontan hypertensiven Ratten (SHR) durchgeführt. Nachfolgend sind die Parameter der Studie aufgelistet.

Versuchstiere:

Zur Studie werden 48 spontan hypertensive Ratten (SHR, Versuchstierzucht Charles River / USA) eingesetzt. Die Tiere haben bei Ankunft ihre 9te Lebenswoche erreicht und werden zunächst 3,5 Wochen an die neue Umgebung, das Messverfahren, sowie die ausführenden Personen gewöhnt, bevor die eigentliche Fütterungsstudie im Alter 12,5 Wochen beginnt. Alle Untersuchungen werden unter Beachtung des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt (Tierantrag Anzeigennummer: 24D-9168.11-1/2006-28, Regierungspräsidium Dresden).

Tierhaltung:

Die Haltung erfolgt auf Standardeinstreu für Labortiere in normierten Makrolonkäfigen der Größe 4 mit Hochdeckeln. Die Nager werden beliebig zu je vier Tieren in jeweils einem Käfig eingeteilt. Die Stallungen unterliegen einem Lichtregime mit je zwölf Stunden künstlichem Licht (400 Lux) ab 6.00 Uhr morgens und Dunkelheit ab 18.00 Uhr abends. Die Raumtemperatur beträgt 20°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 (± 5)%.

Tierfütterung:

Futter und Wasser werden ad libitum zur Verfügung gestellt und deren Aufnahme regelmäßig kontrolliert. Bei dem pelletierten Futter handelt es sich um ein standardisiertes Ratten- und Mäuse Alleinfuttermittel der Firma SSniff (Soest, Deutschland). Die jeweiligen Futterzusätze (siehe Tabelle 3.16-1) werden in entsprechender Menge in das Futter eingemischt und via Kaltpressmethode die Pelletform gepresst. In der Eingewöhnungsphase erhalten alle Tiere das gleiche Futter, ohne Zusatz. Danach wird das jeweilige Futter per Los zugeordnet. Um Verwechslungen des Futters während der Studie zu vermeiden, werden die Pellet jeweils mit einem inerten Farbstoff versehen.

Tabelle 3.15-1: Einteilung der Versuchsgruppen und entsprechender Futterzusatz

Gruppenname	Futter
Captopril (positiv Kontrolle)	Re-Pelletiertes Futter mit 0,07% Captopril
Placebo (negativ Kontrolle)	Re-Pelletiertes Futter ohne Zusätze
HA 3 (=Probe 3)	Re-Pelletiertes Futter mit 20% HA-Säuglingsnahrung
KN 3 (=Probe 16)	Re-Pelletiertes Futter mit 21% konventioneller Säuglingsnahrung

Blutdruckmessung:

Die Blutdruckmessung erfolgte nicht-invasiv an der wachen Ratte mittels tail-cuff-Methode. Bei dieser Bestimmung erfolgt die Messung am Schwanz der Ratte und ist analog der Blutdruckmessung beim Menschen am Oberarm. Die Tiere müssen allerdings vorher erwärmt werden, damit ein Signal aufgenommen werden kann. Dabei werden die Tiere in eine Röhre (Eigenbau Werkstatt TU-Dresden), welche ausreichend mit Lüftungsschlitzen versehen war, gesetzt und die Blutdruckmanschette, wie auch der Pulssensor (FMI, Seeheim, Deutschland) am Schwanz der Ratte angebracht (vgl. Abbildung 3.16-1). Die Nager werden bis eine konstante Herzfrequenz erreicht wird, bei 35°C in einem Wärmekäfig (Eigenbau Werkstatt TU-Dresden) erwärmt, was in der Regel nach 5-7 Minuten erreicht ist. Der Blutdruck wird jeweils mindestens 5mal gemessen und die Werte gemittelt.



Abbildung 3.15-1: Ratte in Messröhre und Wärmebox, sowie die Manschette und Pulsensor am Schwanz

Studienablauf:

Aus organisatorischen Gründen ist es nicht möglich alle 48 Tiere parallel zu untersuchen, daher werden die SHR in drei Versuchsreihen zu je 16 Tieren aufgeteilt. Deswegen stammen die Tiere auch nicht alle aus einer Familie. Mit Versuchsreihe 1 wird die erste Studie durchgeführt, danach folgen 2 und 3, deren Tiere alle einer Familie entsprechen und zur selben Zeit untersucht werden. Da die Anzahl der Tiere pro Käfig auf vier begrenzt ist und es zeitlich nicht möglich ist 32 Tiere pro Tag zu messen, werden diese in Versuchsreihe 2 und 3 eingeteilt. Die Blutdruckmessungen werden persönlich und von Frau B. Zatschler (MTA, Institut für Physiologie, TU-Dresden) durchgeführt. Alle Tiere werden an die Personen, wie auch an die Abläufe der Messungen vor Beginn der eigentlichen Studie gewöhnt (3,5 Wochen). Die Messungen erfolgen zweimal pro Woche zu jeweils der gleichen Zeit. Die Fütterung erfolgt jeweils über 15 Wochen und ist am Ende mit der Tötung aller Tiere vorgesehen.

4. Ergebnisse und Diskussion

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit beschäftigten sich zunächst mit der Charakterisierung des ACE-hemmenden Effektes durch die HA-Nahrungen, der Identifizierung sowie Quantifizierung der Inhibitoren und der Erforschung möglicher physiologischer Konsequenzen.

4.1. ACE-Inhibierung *in vitro*

In diesem Kapitel wird die Bestimmung der inhibierenden Effekte unterschiedlicher Proben auf das ACE vorgestellt sowie die erhaltenen Ergebnisse diskutiert. Der Enzym-Aktivitäts-Test wurde wie in Kapitel 3.3 erläutert durchgeführt und als Inhibitorkenngröße der IC_{50} – Wert bestimmt. Dieser gibt die Konzentration an Hemmstoff an, die nötig ist, um die Enzymaktivität um 50% zu reduzieren. Der Ablauf einer solchen Bestimmung ist nachfolgenden am Beispiel des bekannten pharmazeutisch genutzten ACE-Inhibitors Captopril dargestellt. Abbildung 4.1-2 zeigt zum einen das RP-HPLC-Chromatogramm eines ACE-Aktivitätstests ohne bzw. einmal mit Inhibitorzusatz.

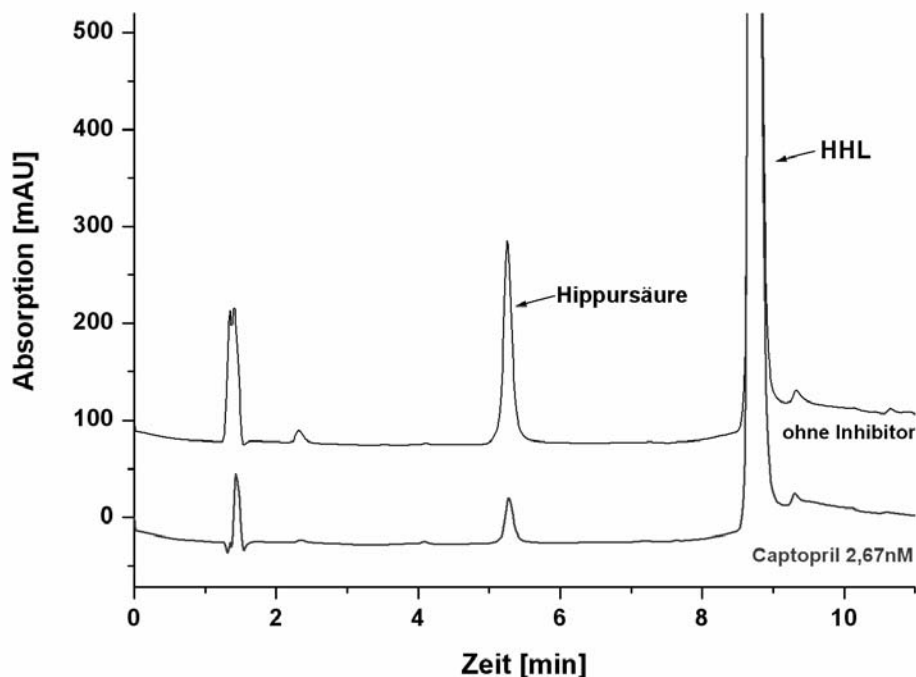


Abbildung 4.1-1: RP-HPLC-Chromatogramm des ACE-Aktivitätstests ohne und mit Inhibitor-Zugabe (Captopril 2,67 nM); Detektion bei $\lambda = 228$ nm

Deutlich zu erkennen ist der minimierte Gehalt an Hippursäure durch die Captoprilzugabe. Nach einer Messreihe entsprechender Verdünnungen wurde mittels SigmaPlot der IC_{50} -Wert des Arzneimittels ermittelt (Abbildung 4.1-2).

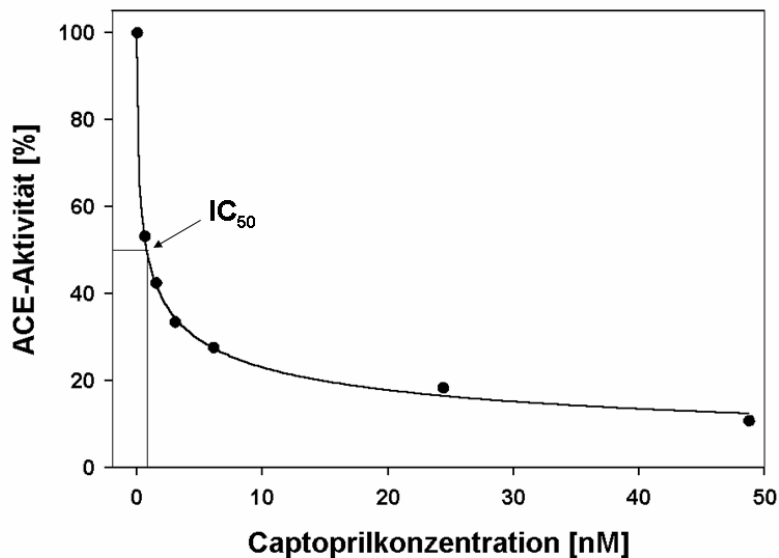


Abbildung 4.1-2: Graphische Darstellung der ACE-Aktivität in Abhängigkeit der Captoprilkonzentration

Es wurde nach einer Dreifachbestimmung eine Konzentration von $(1,3 \pm 0,4)$ nM Captopril bestimmt, die nötig ist, um die Aktivität des ACE um 50% zu reduzieren. Dieser Wert entspricht annähernd den Literaturwerten von 2,3 nM (Zöllner, 1999). Allerdings muss beachtet werden, dass es sich bei dieser Kenngröße um einen von dem verwendeten Testsystem abhängigen Wert handelt. So spielt bei der Ermittlung des IC_{50} -Wertes, wie schon in Kapitel 2.5.1 diskutiert, u. a. die Wahl und Konzentration des Substrates eine wichtige Rolle (Copeland, 1999). Exakter wäre es die Hemmwirkung mittels K_i -Wert anzugeben, allerdings ist es dabei nötig, die Hemmart der jeweiligen Verbindung zu kennen. Dies ist zum einen für jede Substanz sehr aufwendig zu bestimmen und zum anderen auch problematisch, wenn es sich um mehr als eine hemmende Verbindung in komplexer Matrix handelt. Deswegen wurde in dieser Arbeit ausschließlich der IC_{50} -Wert bestimmt, da primär mit Säuglingsnahrungen gearbeitet wurde. Für die folgenden Studien wurden sieben kommerziell erhältliche hypoallergene Säuglingsnahrungen HA1, die für Vollernährung ab der Geburt des Säuglings geeignet sind, verwendet. Des Weiteren wurden die entsprechenden HA2 Nahrungen, welche nach dem vierten Monat bis zum zweiten Lebensjahr empfohlen werden, sowie konventionelle Produkte (sechs Proben ab dem ersten Lebensmonat und jeweils drei Folgenahrungen, die für den Verzehr nach dem vierten bzw. achten Monat

empfohlen werden), in denen intakte Milchproteine als Eiweißquelle eingesetzt wurden, analysiert. Eine detaillierte Auflistung der Inhaltstoffe ist in Kapitel 3. 1 für zwei Beispielsproben zu finden. Neben den kommerziell erhältlichen Milchprodukten für Säuglinge standen zum Vergleich der Untersuchungsergebnisse drei Humanmilchproben als freiwillige Spende zur Verfügung. Der Fettanteil der Muttermilchproben, sowie der aus den Pulvern rekonstruierten Milchen wurden mittels Zentrifugation entfernt. Dies geschah besonders im Hinblick auf weitere RP-HPLC-Untersuchungen der Proben, denn eine Veränderung einer möglichen Wirkung auf die ACE-Aktivität könnte durch Voruntersuchungen ausgeschlossen werden. Es zeigte sich dabei jeweils annähernd der gleiche Effekt, egal, ob die Proben vorher entrahmt wurden, oder nicht. An dieser Stelle sei erwähnt, dass es auch keinen Unterschied machte, ob die Nahrungen mit kaltem Wasser rekonstruiert wurden, oder mit warmen, wie vom Hersteller angegeben. Nach anschließender Gefriertrocknung der entfetteten Nahrungen konnte jeweils mit gleicher Einwaage und entsprechenden Verdünnungen (siehe Kapitel 3.3) der ACE-Aktivitätstest durchgeführt werden. Alle Nahrungen, in denen intaktes Protein vorlag, zeigten ebenso wie die Humanmilchproben selbst bei einer Proteinkonzentration von 1144 mg/l keine Hemmung. Dagegen war bei allen hypoallergenen Säuglingsnahrungen ein deutliches Hemmpotential zu verzeichnen. Allerdings mit enormen Unterschieden. Es konnten jeweils die IC_{50} -Wert der einzelnen Proben bestimmt werden, wobei sich dieser jeweils auf die Proteinkonzentration bezieht, da davon ausgegangen wird, dass die Hemmwirkung nur von den Peptiden, die im eingesetzten Molkenpulver-Hydrolysat vorliegen, hervorgerufen wird. Diese Annahme wird dadurch gestützt, da die konventionellen Produkte keinerlei Inhibierung des ACE zeigten. Die sonstigen Inhaltsstoffe der Nahrungen liegen allerdings in nahezu identischen Konzentrationen vor, so dass davon ausgegangen werden kann, dass weitere Verbindungen, wie bsp. Lactose, Taurin, diverse Mineralstoffe usw. keinen Einfluss auf die ACE-Aktivität haben. Ebenso wie für alle Standardsubstanzen wurde auch hier der IC_{50} -Wert der Proben mittels SigmaPlot 5.0 (vgl. Abbildung 4.1-3) bestimmt und trotz der komplexen Matrix der Milchnahrungen konnten reproduzierbare Werte erreicht werden. Alle in einer Dreifachbestimmung ermittelten IC_{50} -Werte der jeweiligen Produkte, die für eine Ernährung ab der Geburt vorgesehen sind, sind in Abbildung 4.1-4 dargestellt und für die Produkte, welche nach dem vierten Monat angeboten werden, sind die ermittelten IC_{50} -Werte in Abbildung 4.1-5 zu sehen. Zum einem fällt auf, dass durchschnittlich mit den HA1-Nahrungen eine stärkere ACE-Inhibierung erreicht wird als mit den entsprechenden Folgenahrungen (vgl. Abbildung 4.1-5). Für zwei Nahrungen (Probe 1 und 4) sind allerdings auch ca. 100 mg Protein/l für eine 50%ige Aktivitätsreduzierung nötig. Bei Probe 7 handelt es

sich um eine, nach Herstellerangaben, besonders stark hydrolysierte HA-Säuglingsnahrung. Bei dieser wurde neben dem Einsatz eines stark behandelten Molkenproteinhydrolysat auch eine Ultrazentrifugation durchgeführt, bei der der Großteil des restlichen intakten Proteins, sowie große Oligopeptide entfernt wurden.

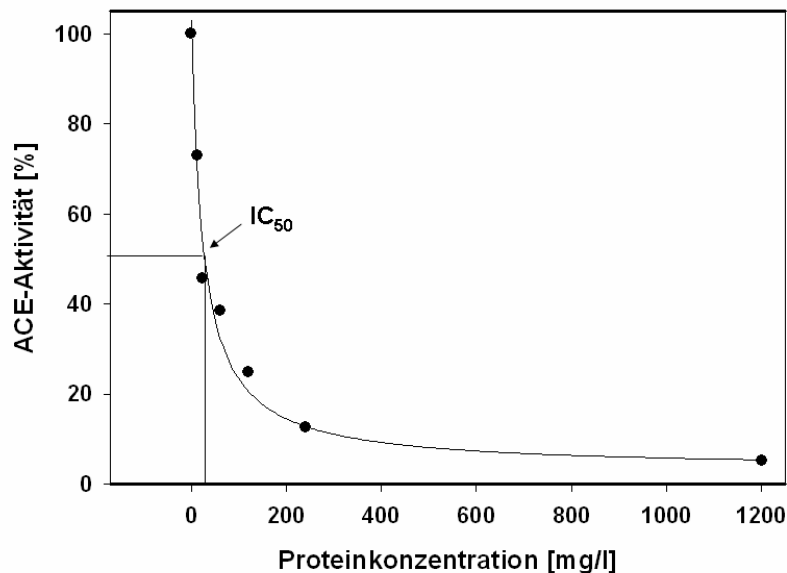


Abbildung 4.1-3: Graphische Darstellung der ACE-Aktivität in Abhängigkeit der Proteinkonzentration am Beispiel von Probe 3

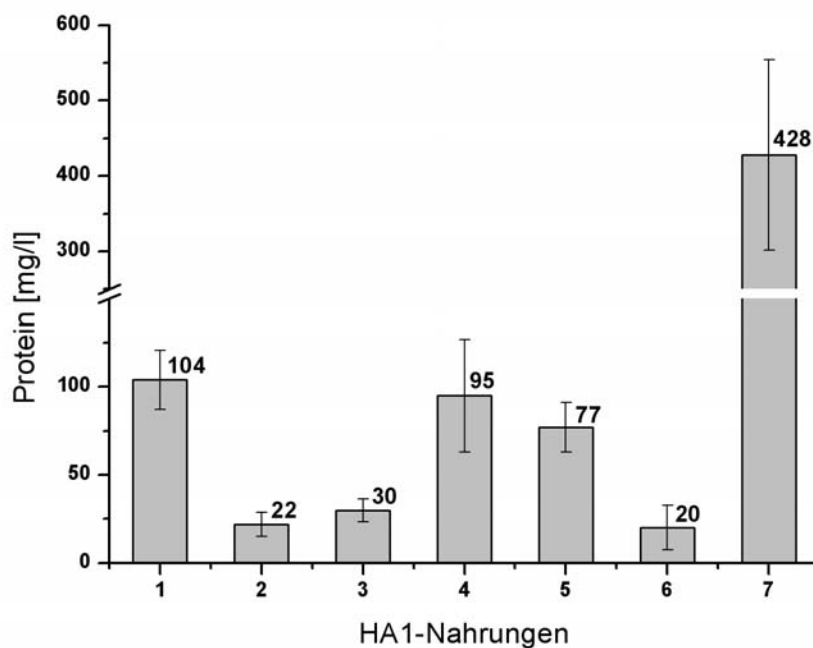


Abbildung 4.1-4: IC_{50} -Werte der HA1-Nahrungen (zum Verzehr ab der Geburt geeignet) in mg Protein / l

Dagegen zeigen aber auch Nahrungen (Probe 2, 3 und 6) in dieser Kategorie, dass deutlich geringere Konzentrationen mit nur 20 – 30 mg Protein/l ausreichend sind, um den gleichen Effekt hervorzurufen.

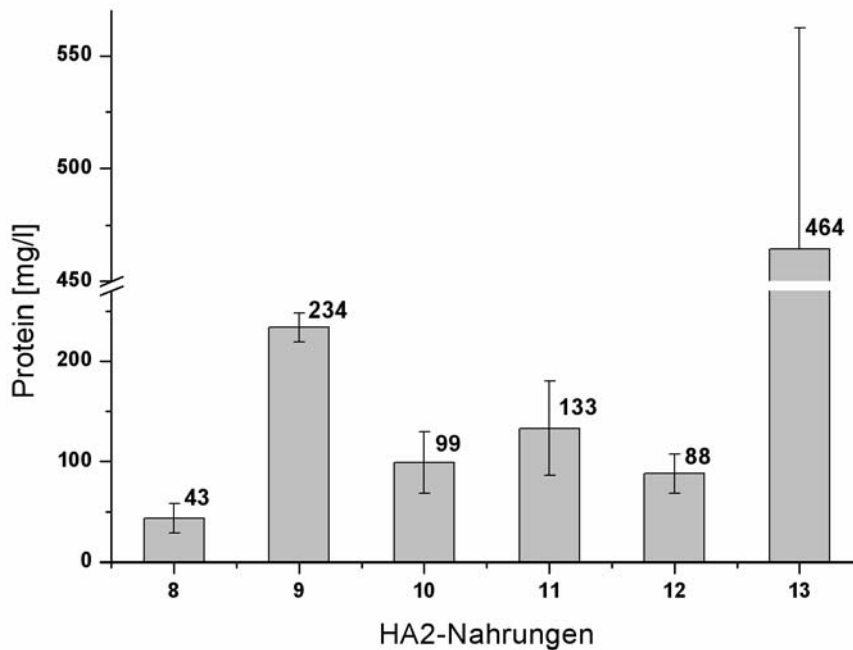


Abbildung 4.1-5: IC₅₀-Werte der HA2-Nahrungen (zum Verzehr nach dem vierten Monat geeignet) in mg Protein /l

Die Folgenahrungen der HA1-Produkte zeigten im Mittel eine schlechtere Hemmwirkung, die teilweise sehr unterschiedlich war. Die Proben 10, 11 und 12 zeigten bei annähernd gleicher Proteinkonzentration, von ca. 100 mg/l auch einen ähnlich hemmenden Effekt. Probe 8 bewirkte in dieser Nahrungskategorie mit einem IC₅₀-Wert von nur 43 mg/l die stärkste Hemmwirkung, während von 9 und 13 über 200 bzw. über 450 mg Protein/l nötig sind, um den gleichen Effekt hervorzurufen. All diese Produkte zeigten nur minimale Unterschiede in ihrer Zusammensetzung, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die deutlichen Unterschiede durch unterschiedlich hergestellte Proteinhydrolysate herrühren müssen. Da die Hemmwirkung nur von einigen Peptiden aus den Molkenhydrolysaten hervorgerufen wird, zeigen diese niedrigen Werte, so dass es sehr wahrscheinlich ist, dass auch sehr potente ACE-Inhibitoren in den Säuglingsnahrungen vorliegen. Um zu verdeutlichen, wie stark die Hemmung durch die HA-Nahrungen ist, wurden Sauer Milchprodukte, die vom Hersteller mit einer blutdrucksenkenden Wirkung auf Grund der enthaltenen Tripeptide IPP und VPP, ausgelobt werden, mit dem etablierten ACE-Aktivitätstest untersucht. Der dabei ermittelte IC₅₀-Wert, bezogen auf den Proteingehalt der Probe lag bei (645 ± 51) mg Protein/l. Dieser lag deutlich höher als der der am schlechtesten inhibierenden HA-Nahrung. Bezogen auf den

Gehalt an bioaktiven Peptiden in dem Produkt, der vom Hersteller als Gehalt an IPP und VPP mit deklariert wird, lag der IC_{50} -Wert bei $(1,6 \pm 0,4)$ mg bioaktive Peptide/l.

In 65 ml Evolus sind 5 mg bioaktive Peptide enthalten. Dabei werden keine Angaben über die Mengenverhältnisse der beiden Peptide gemacht. Die IC_{50} -Werte der beiden Tripeptide sind in der Literatur mit 5 μ M für IPP und 9 μ M für VPP angegeben, was 1,6 mg/l bzw. 2,8 mg/l entspricht. Da das inhibierende Potential sehr ähnlich ist, dürften unterschiedliche Konzentrationen der Einzelpeptide keinen großen Einfluss auf das Gesamtinhibierungspotential zeigen. Würde die vom Hersteller angegebene Konzentration an 5 mg bioaktiven Peptiden nur dem IPP ($IC_{50} = 1,6$ mg/l) entsprechen, würde dies exakt mit dem oben bestimmten Hemmeffekt übereinstimmen.

4.2. Bestimmung des Hydrolysegrades der Molkenproteine in HA-Nahrungen über die Molmassenverteilung mittels Gel-Permeationschromatographie

Die sehr unterschiedlichen Ergebnisse in der ACE-Hemmwirkung der einzelnen HA-Nahrungen waren überraschend, da es sich, mit Ausnahme von Probe 7, um Produkte handelte, die nahezu identische Inhaltstoffe mit auch quantitativ annähernd gleichen Gehalten aufwiesen. Eventuell könnten die Unterschiede auf verschieden stark hydrolysierte Molkenproteine zurückzuführen sein. Um dies aufzuklären, wurden die Proben mittels Gel-Permeationschromatographie (GPC) untersucht. Nach entsprechender Kalibrierung mit Standardsubstanzen kann bei dieser Analysenmethode eine Massenzuordnung getroffen werden. Allerdings wurde auch festgestellt, dass die Polarität der Peptide ebenso eine Rolle für die Elution spielt. Stark polare Verbindungen eluierten meist später, außerhalb ihres Massenbereiches. Dennoch kann mit dieser Methode eine allgemeine Aussage über den Hydrolysegrad der Molkenproteine getroffen werden und damit eventuelle Rückschlüsse über die Unterschiede in ihrer ACE-Hemmwirkung. Zur Bestimmung der Molmassenverteilung wurden Lösungen der entrahmten Proben (10 mg/ml) chromatographisch aufgetrennt und bei 220 sowie 280 nm detektiert. Zur Spaltung vorliegender Disulfidbrücken der Molkenproteine wird empfohlen, eine Reduktion mittels 1,4-Dithiothreitol (DTT) durchzuführen. Ein Vergleich der reduzierten mit den nicht reduzierten Proben zeigte jedoch neben einer schlechteren Auftrennung auch einen störenden Einfluss des Reduktionsmittels DTT selbst. Daher wurde auf diese Vorbehandlung der Proben für die weiteren Untersuchungen verzichtet und die entrahmten Nahrungen direkt eingesetzt. Es wurden alle hypoallergen S Säuglingsnahrungen (sieben HA1- und sechs HA2-Nahrungen) sowie zwei konventionelle

Produkte mit intaktem Protein untersucht. Nach entsprechender Kalibrierung mit Standardsubstanzen war es möglich, die erhaltenen Chromatogramme in fünf Abschnitte – ein höherer, drei mittlere sowie ein niederer Molmassenbereich - einzuteilen. Die festgelegten Grenzen sind in Tabelle 4.2-1 zusammengefasst und in den folgenden Chromatogrammen mit abgebildet. Allgemein kann gesagt werden, dass mit steigendem Hydrolysegrad die Verteilung der Molmassen in den niedermolekularen Bereich verlagert wird, d. h. der Anteil an intaktem Protein sinkt und die Menge niedermolekularer Substanzen nimmt zu.

Tabelle 4.2.-1: Einteilung der Molmassenbereiche nach Bestimmung mittels GPC

Molmassenbereich	[kDa]
höherer Molmassenbereich	61,0 – 24,0
mittlerer Molmassenbereich I	24,0 – 4,0
mittlerer Molmassenbereich II	4,0 – 1,0
mittlerer Molmassenbereich III	1,0 – 0,175
niederer Molmassenbereich	< 0,175

In Abbildung 4.2-1 ist ein Beispiel-Chromatogramm der Molmassenverteilung einer konventionellen Probe dargestellt. Aus der Abbildung ist deutlich zu erkennen, dass in der Probe intaktes Milchprotein vorliegt, welches in den Molmassenbereichen I und II eluiert. Die Milchproteine weisen alle ein Molekulargewicht unter 26 kDa auf, was auch im Chromatogramm bestätigt wird. Nur Serumalbumin bildet mit 66,3 kDa eine Ausnahme, allerdings ist der prozentuale Anteil dieses Proteins hier zu gering, um deutlich sichtbar im Chromatogramm zu erscheinen. Wenig kleine Peaks eluieren auch im niedermolekularen Bereich unter 1 kDa, dabei handelt es sich zum einen um freie Aminosäuren, weitere in der Milch vorkommende UV-aktive Substanzen wie diverse Vitamine, und natürlicherweise vorkommende Peptide. Die GPC-Chromatogramme der HA-Nahrungen zeigten dagegen deutlich den Abbau der Molkenproteine, wie in Abbildung 4.2-2 am Beispiel der Probe 3 dargestellt.

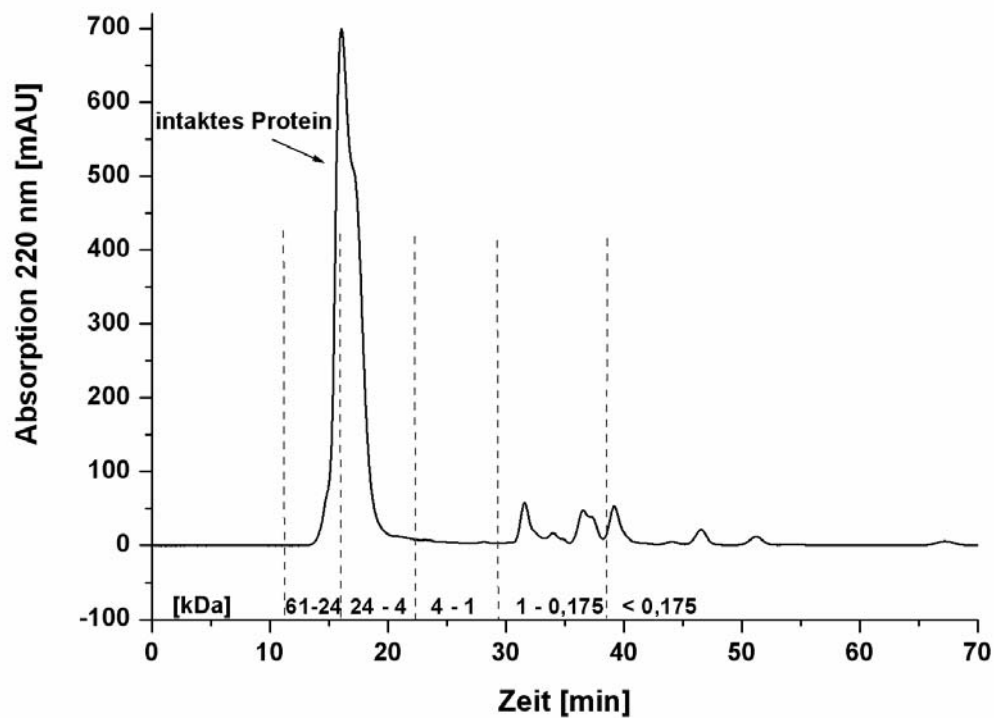


Abbildung 4.2-1: GPC-Chromatogramm der konventionellen Säuglingsnahrung (KN 3) mit entsprechend eingeteilten Molmassenbereichen; Detektion $\lambda = 220$ nm

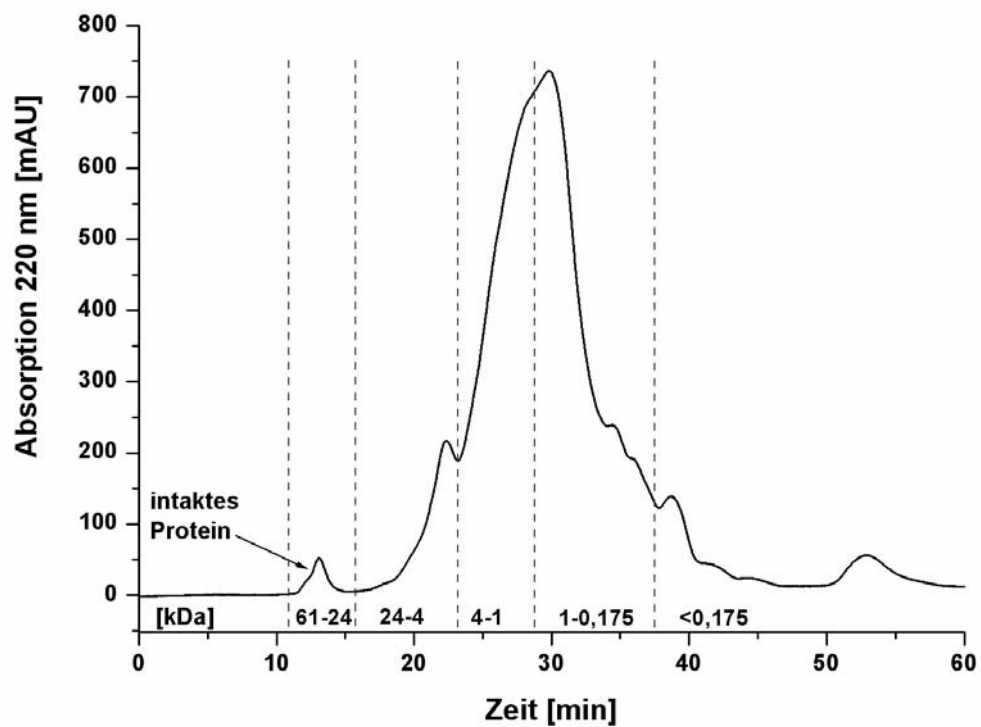


Abbildung 4.2-2: GPC-Chromatogramm der hypoallergen Säuglingsnahrung (HA 3) mit entsprechend eingeteilten Molmassenbereichen; Detektion $\lambda = 220$ nm

Im Gegensatz zu der konventionellen Nahrung liegen hier nur noch geringe Mengen an intaktem Protein vor, die während der Hydrolyse des Molkenproteins nicht verdaut wurden. Den größten Anteil machen die Peptide mit einer Molmasse zwischen 4 und 0,175 kDa aus. Ein Vergleich mit anderen HA1 Proben ist in Abbildung 4.2-3 dargestellt. Hier werden Probe 3, die mit die stärkste ACE-Hemmung verursachte, und Probe 2 mit der schlechtesten Inhibierung gegenübergestellt. Probe 7 ist, wie schon erwähnt, als eine besonders Nahrung mit besonders stark hydrolysiertem Molkenprotein ausgelobt. Des Weiteren wird laut Hersteller durch bestimmte technologische Verfahren das Restprotein nach dem Verdau entfernt. Dies konnte mit den GPC-Untersuchungen bestätigt werden. Die Probe zeigt im Gegensatz zur HA1-Nahrung Nr. 3 keinerlei Restgehalte an Protein. Auch weist sie einen leicht höheren Gehalt an niedermolekularen Verbindungen, besonders freien Aminosäuren, auf, was auch auf eine starke Hydrolyse hindeutet. Dies lässt die Interpretation zu, dass bei der Herstellung des Molkenproteinhydrolysates dieser Nahrung ACE-hemmende Peptide wieder abgebaut wurden, während diese in Probe 3 wahrscheinlich noch vorliegen, obwohl auch hier ein relativ hoher Hydrolysegrad vorliegt.

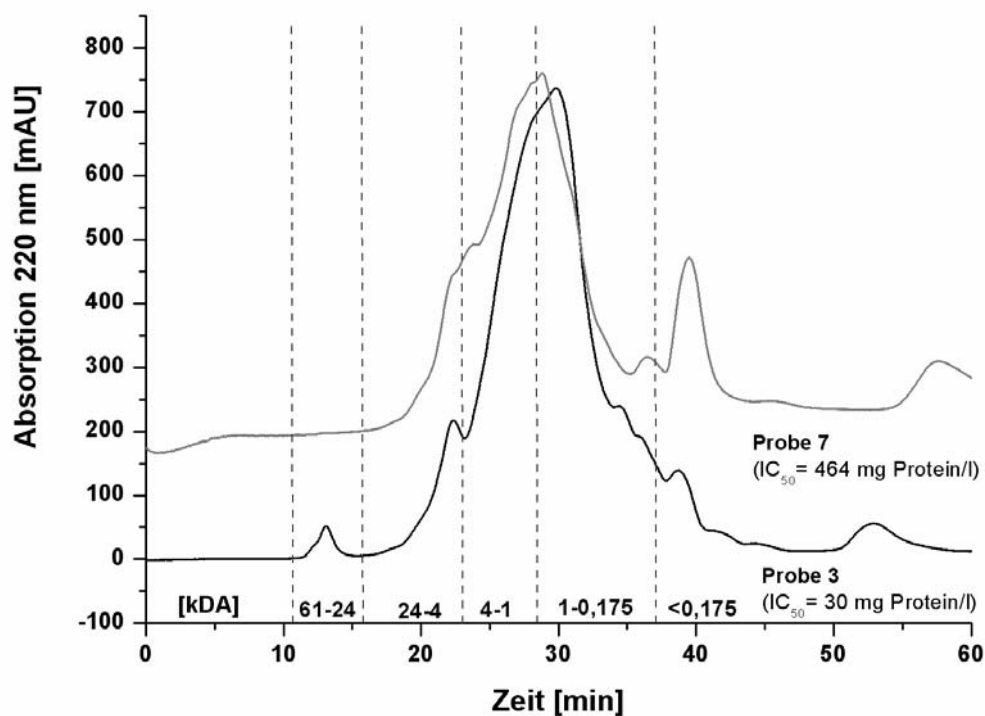


Abbildung 4.2-3: GPC-Chromatogramme zweier HA-Nahrungen (Probe 3 bzw. 7) mit entsprechend eingeteilten Molmassenbereichen; Detektion $\lambda = 220$ nm

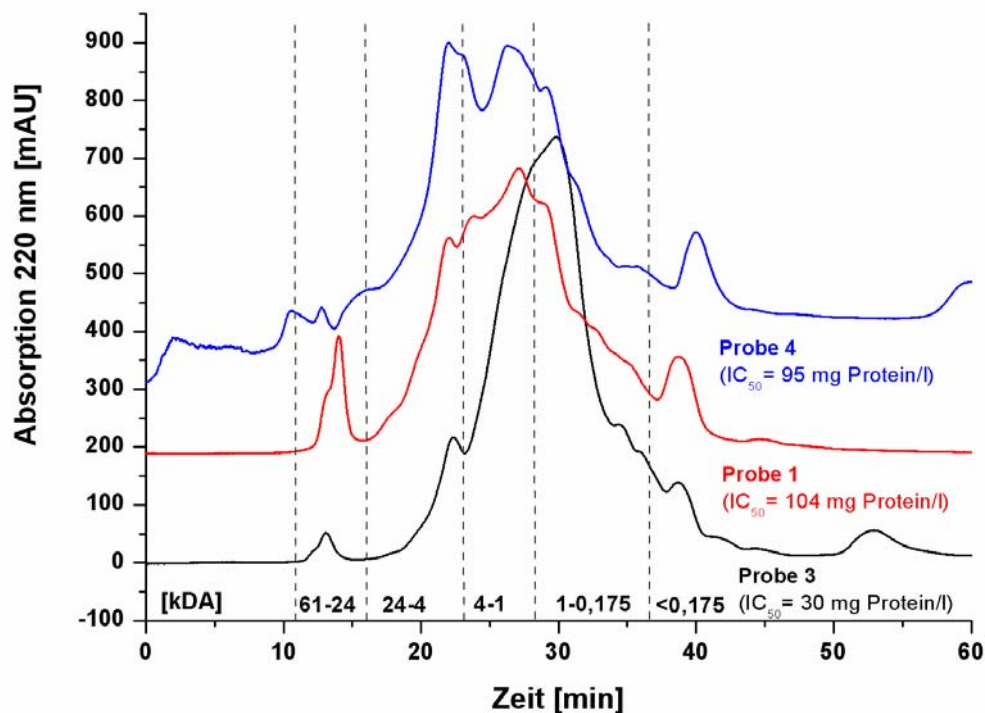


Abbildung 4.2-4: GPC-Chromatogramme von drei HA-Nahrungen (Probe 3; 1; 4) mit entsprechend eingeteilten Molmassenbereichen; Detektion $\lambda = 220$ nm

Die Darstellung in Abbildung 4.2-4 zeigt zwei HA1-Nahrungen mit fast identischer Hemmwirkung im Vergleich zur Probe 3. Anhand dieser Gegenüberstellung könnte ein geringerer Hydrolysegrad auch auf eine schlechtere ACE-Inhibierung hindeuten. Probe 4 und 1 zeigen beispielsweise einen fast identischen Hemmeffekt und einen ähnlichen chromatographischen Verlauf, wobei bei Probe 1 noch mehr intaktes Protein vorhanden ist. Da beide Proben im höhermolekularen Anteil größere Gehalte aufweisen, könnte diskutiert werden, dass damit weniger potentielle Peptid-Inhibitoren vorliegen und daher eine im Vergleich mit Probe 3 schlechtere ACE-Inhibierung erreicht wird. Allerdings ist eine Interpretation anhand der Chromatogramme alleine nicht aussagekräftig. So widerlegt z. B. ein Vergleich der HA1-Nahrungen mit den HA2-Produkten, die im Durchschnitt eine schlechtere Hemmung zeigten, einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Hydrolysegrad und dem Inhibierungsvermögen, wie beispielsweise in Abbildung 4.2-5 demonstriert. In der Abbildung sind die Molmassenverteilungen von zwei HA1-Säuglingsnahrungen und einer HA2-Nahrung zu sehen. Einen nahezu identischen Hydrolysegrad zeigen Probe 3 und die Probe 10, das HA2-Produkt. Dies ist nicht verwunderlich, da es sich hier um Säuglingsnahrungen des gleichen Herstellers handelt und anzunehmen ist, dass auch für die Folgenahrung auf das gleiche Molkenproteinhydrolysat zurückgegriffen wird, wie es für die HA1-Nahrung auch eingesetzt wird. Allerdings

unterscheiden sich die beiden Proben doch deutlich in ihrem IC_{50} -Wert, während Probe 1 eine ähnliche Hemmwirkung wie Probe 10 zeigte, aber einen sichtbar geringeren Hydrolysegrad aufweist.

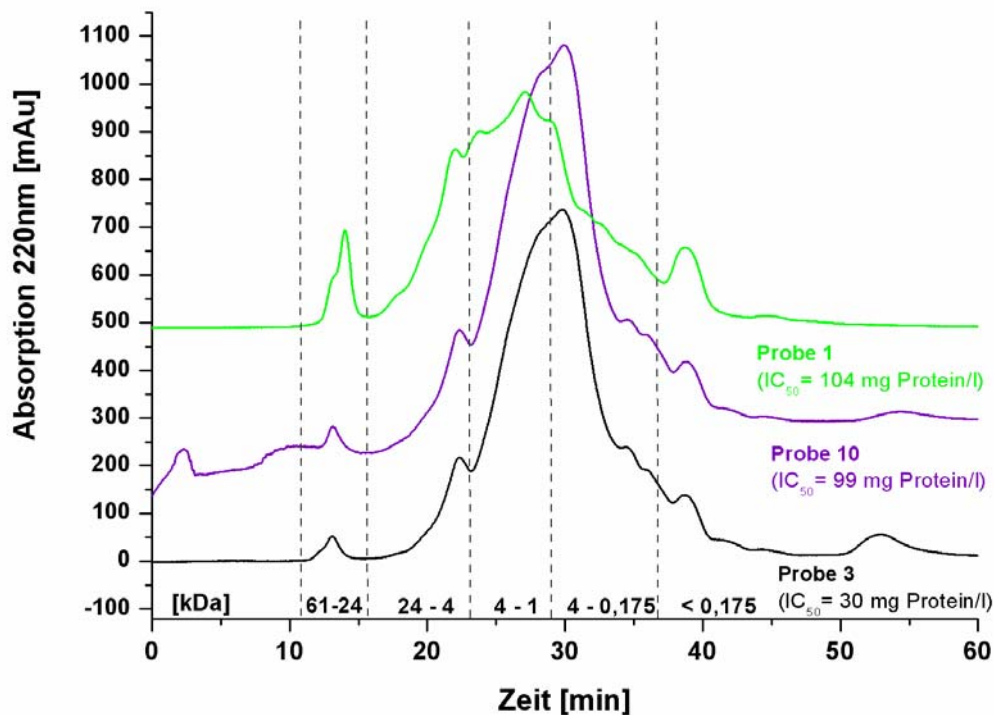


Abbildung 4.2-5: GPC-Chromatogramme von drei HA-Nahrungen (Probe 3; 10; 1) mit entsprechend eingeteilten Molmassenbereichen; Detektion $\lambda = 220$ nm

Um den Hydrolysegrad der einzelnen Nahrungen näher zu bestimmen, wurden die Gehalte an niedermolekularen Verbindungen herangezogen. Je mehr Verbindungen im mittleren Molmassenbereiche II und III ($< 0,175 - 4,0$ kDa) vorliegen, desto stärker ist das eingesetzte Molkenprotein hydrolysiert, da andere Inhaltsstoffe der HA Nahrung qualitativ sowie quantitativ nahezu identisch waren.

Aus der tabellarischen Zusammenstellung kann offensichtlich keine Beziehung zwischen den IC_{50} -Werten und Hydrolysegraden ermittelt werden. Daher wurde für eine weitere Auswertung eine graphische Darstellung gewählt. Es wurden die IC_{50} -Werte gegen das Verhältnis des relativen Gehaltes an kleinen Peptiden ($< 0,175 - 4,0$ kDa) zu der Gesamtpeakfläche ($< 0,175 - 61,0$ kDa) aufgetragen. Diese Darstellung ist in Abbildung 4.2-6 dargelegt.

Tabelle 4.2.-2: IC₅₀-Werte [mg Protein/l] und prozentuale Flächenanteile (< 0,175-4,0 kDa) der HA1- und HA2-Nahrungen.

HA 1	IC ₅₀ [mg Protein/l]	Prozentualer Flächenanteil (< 0,175-4,0 kDa)	HA 2	IC ₅₀ [mg Protein/l]	Prozentualer Flächenanteil (< 0,175-4,0 kDa)
1	104	73,3			
2	20	82,2	8	43	62,9
3	30	90,8	9	234	63,8
4	95	69,2	10	99	83,4
5	77	71,1	11	133	63,7
6	22	65,2	12	88	65,4
7	428		13	464	76,2

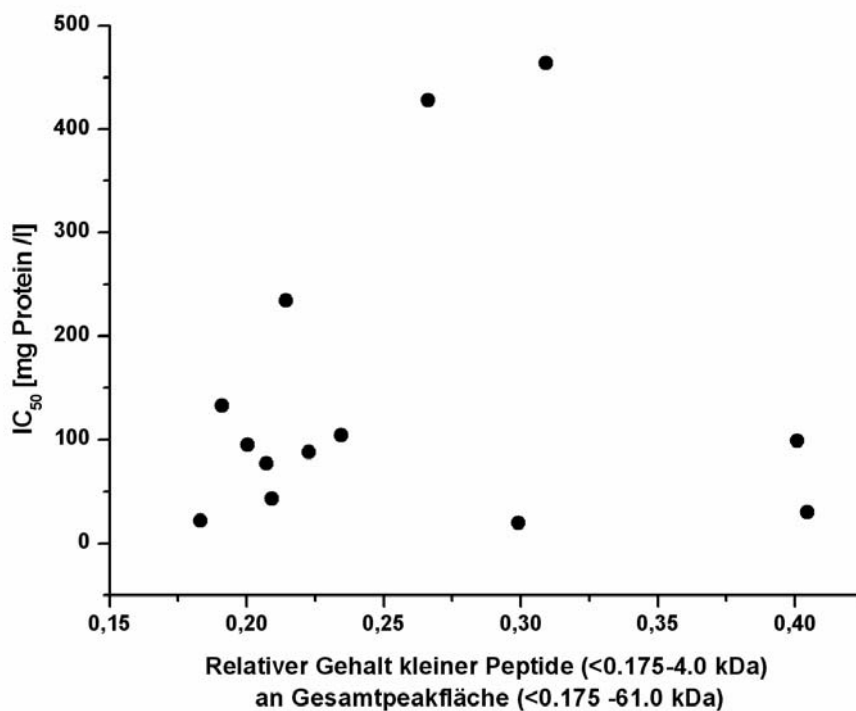


Abbildung 4.2-6: IC₅₀-Werte der HA-Nahrungen in Abhängigkeit des relativen Gehaltes kleiner Peptide (< 0,175 – 4,0 kDa) zur Gesamtpeakfläche (< 0,175 – 61,0 kDa)

Aus dieser Darstellung ist zu erkennen, dass die Proben mit einem relativ geringen Gehalt an niedermolekularen Peptiden zwischen 0,175 und 4,0 kDa einen niedrigen IC₅₀-Wert, d. h. eine sehr gute ACE-Inhibierung aufweisen. Nimmt der Gehalt an Peptiden zu und der Molmassenbereich II und II wird größer, zeigt sich, mit einer Ausnahme, ein Verlust des ACE-hemmenden Potentials, welches mit steigendem Hydrolysegrad wieder ansteigt. Durch die vorangeschrittene Hydrolyse könnte es zu einem Abbau der vorher inhibierenden Peptide

gekommen sein, was eine schlechtere ACE-Hemmung erklären wurde. Durch den weiteren enzymatischen Verdau bilden sich wieder neue Hemmstoffe und der IC_{50} -Wert sinkt erneut stark ab. Dennoch ist diese Illustration nicht ausreichend, um einen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Molmassenverteilung und den entsprechenden IC_{50} -Werten ableiten zu können, bzw. um allein anhand des Hydrolysegrades das ACE-inhibierende Potential eines Lebensmittels abzuschätzen. Liegt das Verhältnis der kleinen Peptiden zu dem Gesamtbereich molarer Massen in etwa bei 0,30 kann nicht beurteilt werden, ob die Inhibierung sehr stark (IC_{50} ca. 20 mg Protein/l) oder eher gering (IC_{50} ca. 450 mg Protein/l) ist. Ferner liegt bei einem Verhältnis von ca. 0,18-0,25 ein großer Schwankungsbereich der IC_{50} -Wert zwischen 40 und 235 mg Protein/l vor, was im Extremfall einer sehr guten bzw. eher mäßigen ACE-Hemmung entsprechen würde. Damit kann der Hydrolysegrad des eingesetzten Molkenproteins alleine nicht für eine Interpretation des Inhibierungspotentials herangezogen werden. Weitere Untersuchungen, die Aufschluss über die Verteilung der Hydrolyseprodukte des Molkenproteins geben sollten, wie RP-HPLC, Bestimmung der freien Aminosäuren, sowie Bestimmung des Gesamtaminosäuregehaltes zeigten ebenfalls keine Zusammenhänge zu dem ACE-inhibierenden Potential und werden daher auch nicht näher erläutert. Die durchgeführten Untersuchungen lassen schlussfolgern, dass in den HA-Nahrungen geringe Mengen an sehr potenten ACE-Inhibitoren bzw. eine große Anzahl verschiedener Hemmstoffe vorliegen. Auf Grund geringer Unterschiede im technologischen Verfahren zur Herstellung des verdauten Molkenproteins scheint es zu einer unterschiedlichen Verteilung an Peptid-Inhibitoren zu kommen, was die verschiedenen IC_{50} -Werte der Proben erklärt. Daher war es im Folgenden von Interesse, die Peptide mit ACE-hemmender Wirkung aus den Säuglingsnahrungen zu isolieren, identifizieren und anschließend zu quantifizieren.

4.3. Identifizierung potenter ACE-Inhibitoren in hypoallergenen Säuglingsnahrungen

Die Identifizierung der ACE-Inhibitoren in den HA-Nahrungen konzentrierte sich auf Grund der Komplexität der Proben auf die hemmenden Peptide, von denen der höchste Einfluss auf das Gesamtinhibierungspotential der Nahrungen zu erwarten war. Dabei handelt es sich um sehr potente Hemmstoffe und in ausreichenden Mengen vorliegende Verbindungen. Die untersuchten HA-Nahrungen wurden für die nachfolgenden Analysen entrahmt und intakte Proteine, sowie langkettige Oligopeptide mittels Acetonitril abgetrennt. Eine detaillierte Beschreibung hierfür ist in Kapitel 3.2 in Material Methoden-Teil zu finden. Dadurch kam es u. a. zu einem veränderten Proteinanteil, der für die Identifizierung keine Rolle spielt, jedoch

für die anschließende Quantifizierung der ACE-hemmenden Peptide. Daher wurde dieser neu bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im Kapitel 4.4, das sich mit der Quantifizierung beschäftigt, erläutert. Die Charakterisierung der Peptidinhibitoren erfolgte mittels LC-ESI-TOF-MS, um die Molmassen der einzelnen Verbindungen in der HA-Nahrung zu erhalten. Für die jeweilige Masse wurden mit der Software Biospectrometry Data Explorer™ (Mariner™, Applied Biosystems Stafford, USA) mögliche Aminosäurekombinationen ermittelt. Dabei wurden jeweils die Aminosäurekombinationen mit der höchsten Wahrscheinlichkeit (durchschnittlich 99 %) ausgewählt, die sich signifikant von allen weiteren angegebenen Möglichkeiten unterschieden. Damit und dem Wissen, dass in den untersuchten HA-Nahrungen hydrolysiertes Molkenprotein als Eiweißquelle eingesetzt wird, wurden anschließend die möglichen Peptide mit den Aminosäuresequenzen der Molkenproteine α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin, Rinderserumalbumin, κ -Casein-Glycopeptid und Proteose-Pepton (β -Casein 1-28, 1-105 und 1-107) verglichen. Mit dieser Methode konnte erreicht werden, dass aus den zahlreichen möglichen Aminosäurezusammensetzungen die Peptide ausgeschlossen werden konnten, für die zwar eine Molmasse ermittelt wurde, die allerdings in der Sequenz der oben genannten Proteine nicht vorkommen. Abbildung 4.3-1 zeigt ein LC-Chromatogramm der unfraktionierten Probe 3 mit UV-Detektion bei 220 nm, in dem die Verbindungen nach ihrer Polarität aufgetrennt wurden.

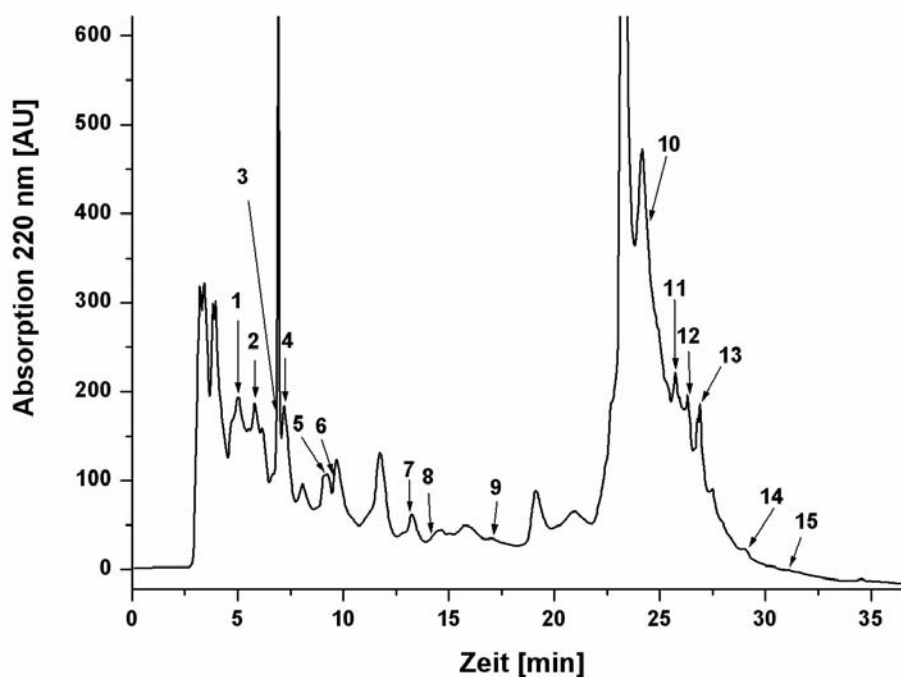


Abbildung 4.3-1: RP-HPLC-Chromatogramm der hypoallergen Säuglingsnahrung Probe 3; Detektion λ = 220 nm

Eine Trennung aller detektierten Peaks ist chromatographisch nicht möglich, aber dennoch konnte eine Peakzuordnung getroffen werden, da nach spezifischen Massen gesucht und diese der jeweiligen Elutionszeit zugeordnet wurden. Über die Bestimmung der Molmassen konnten neben anderen auch Peptide mit starker ACE-Hemmung ermittelt werden (vgl. Tabelle 4.3-1). Am Beispiel von Peak 6, für den wie für die meisten Verbindungen der Probe keine Grundlinientrennung erreicht werden konnte, soll die Interpretation der Untersuchungsergebnisse verdeutlicht werden. Zunächst wurde hauptsächlich die molare Masse $[M+H]^+ = 281,2$ m/z detektiert (siehe Abb. 4.3-2).

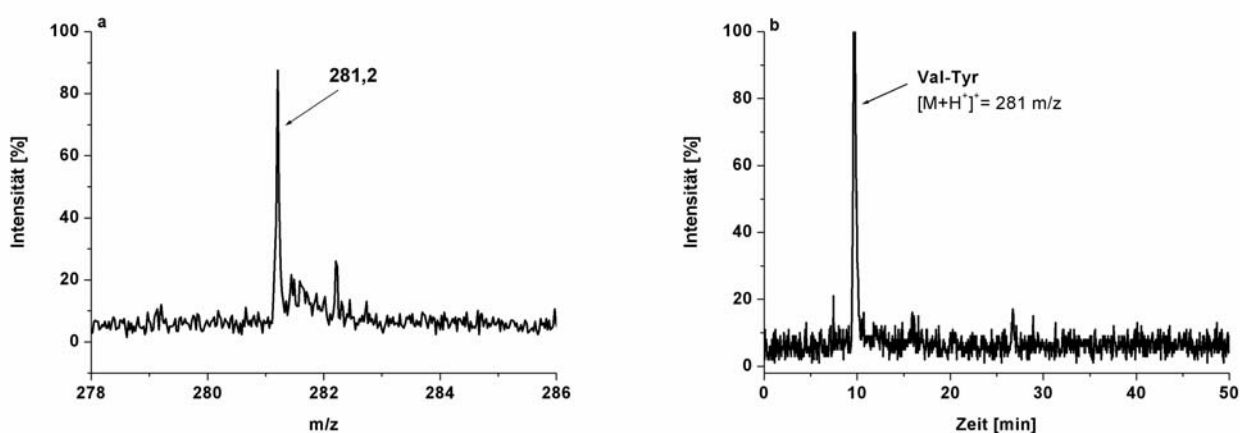


Abbildung 4.3-2: Massenspektrum für Peak 6 (Probe 3 vgl. Abb. 4.3-1), sowie das für die Masse $[M+H]^+ = 281$ m/z spezifische XIC-Chromatogramm

Diese Masse konnte dem Peptid Val-Tyr (VY), welches in der Sequenz des β -Lactoglobulins an Position 41-42 vorliegt, zugeordnet werden. Um zu prüfen, ob die Masse mehrmals in der HA-Nahrung existiert und damit weitere Verbindungen möglich sind, bzw. das Peptid VY möglicherweise zu einem späteren Zeitpunkt eluieren würde, wurde das gesamte Chromatogramm spezifisch nach dieser Masse abgesucht. In Abbildung 4.3-2 ist das Ergebnis dieser Untersuchungen zu sehen. Im Extracted-Ion-Chromatogramm (XIC) wurde diese Masse für nur einen einzigen Peak detektiert. Dennoch war nicht immer eine eindeutige Zuordnung zu nur einem Peptid möglich. Bei Peak 1 könnte es sich beispielsweise um GL oder auch LG handeln (vgl. Tabelle 4.3-1). Um dies aufzuklären, wären weitere Analysen mit den entsprechenden Standardpeptiden nötig. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit nicht verfolgt, da es sich bei den genannten Inhibitoren um keine sehr stark hemmenden Verbindungen handelt und davon auszugehen ist, dass diese eine eher untergeordnete Rolle für das Gesamt-Inhibierungspotential der HA-Nahrung spielen. Für Peak 7 und 8 wurde die gleiche molare Masse $[M+H]^+ = 288,3$ m/z ermittelt, die den beiden Peptiden IR bzw. RI zugeordnet werden kann. Peak 9 mit einer molaren Masse von $[M+H]^+ = 295,3$ m/z eluiert

nur einmal, aber es sind zwei Molkenpeptide möglich, LY bzw. YL. Durch die konsequente Verfolgung dieser Strategie konnten die in Tabelle 4.3-1 zusammengefassten Peptide als die wichtigsten niedermolekularen ACE-inhibierenden Peptide in Probe 3 ermittelt werden.

Tabelle 4.3-1: Identifizierte ACE-inhibierende Peptide in Probe 3 sowie die dazugehörigen IC₅₀-Werte aus der Literatur, bzw. in Klammern die eigenen Bestimmungen

Peptid-Nummer	Retentionszeit [min]	Detektierte Peptidmasse M+H ⁺ [Da]	Theoretische Peptidmasse M+H ⁺ [Da]	Sequenz	IC ₅₀ [μM]	Literaturquelle
1	5,0	189,2	189,22	Gly-Leu oder Leu-Gly	2500 8800	<i>Cheung et al. (1980)</i>
2	6,7	175,2	175,2	Gly-Val or Val-Gly	4600 1100	<i>Cheung et al. (1980)</i>
3	7,2	279,1	279,13	Tyr-Pro	185	<i>FitzGerald, Meisel (1999)</i>
4	8,8	189,2	189,22	Gly-Ile	647	<i>FitzGerald, Meisel (1999)</i>
5	9,2	239,1	239,08	Gly-Tyr	210 (180 ± 20)	<i>Cheung et al. (1980)</i>
6	9,8	281,2	281,13	Val-Tyr	35 (26 ± 7)	<i>Sato et al. (2002)</i>
7	12,8	288,3	288,34	Ile-Arg	695	<i>FitzGerald, Meisel (1999)</i>
8	14,4	288,3	288,34	Arg-Leu	2439	<i>FitzGerald, Meisel (1999)</i>
9	17,4	295,3	295,31	Tyr-Leu oder Leu-Tyr	122/ 44	<i>Cheung et al. (1980)</i>
10	25,1	300,2	30,20	Ile-Pro-Ala	141	<i>FitzGerald, Meisel (1999)</i>

Peptid-Nummer	Zeit [min]	Detektierte Peptid-masse $M+H^+$ [Da]	Theoretische Peptidmasse $M+H^+$ [Da]	Sequenze	IC ₅₀ [μ M]	Literatur-quelle
11	26,2	318,2	318,17	Ile-Trp	1,5 (0,7 \pm 0,3)	<i>Sato et al.</i> (2002)
12	26,9	392,2	279,13	Leu-Phe	349 (247 \pm 22)	<i>FitzGerald, Meisel</i> (1999)
13	27,3	318,2	318,17	Trp-Leu	10 \pm 1,7	<i>Kuba et al.</i> (2003)
14	29,0	392,2	392,25	Leu-Leu-Phe	80	<i>Hernandez-Ledesma et al.</i> , (2002)
15	31,4	439,3	439,35	Ala-Leu-Met-Pro	928	<i>Lopez-Fandino et al.</i> , (2006)

Die Untersuchungen mittels LC-ESI-TOF-MS zeigten, dass in der Probe 3 für die Peaks 11 und 13 jeweils die einfach protonierte molare Masse von $[M+H]^+ = 318,2$ m/z vorliegt. Beide Substanzen zeigen des Weiteren ein UV-Maximum bei 278 nm, was typisch für aromatische Verbindungen, wie Tryptophan ist. In Abbildung 4.3-3 ist das Massen- sowie UV-Spektrum für Peak 11 dargestellt. (Peak 13 ergab identische Spektren und ist daher nicht extra aufgeführt.)

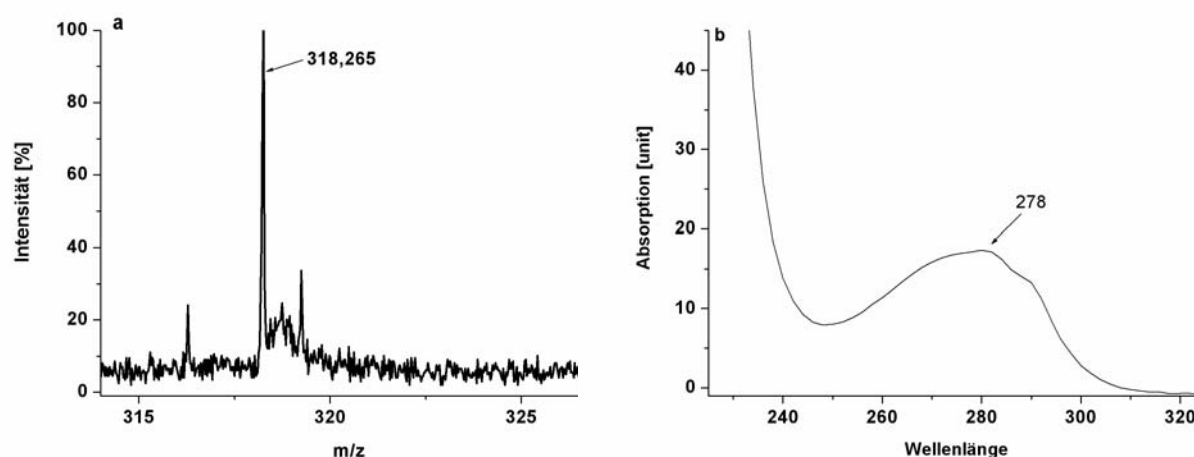


Abbildung 4.3-3: Massen (a)- sowie UV-Spektrum (b) für Peak 11 (Probe 3, vgl. Abb. 4.3-1)

Der entsprechenden molaren Masse von 317,2 g/mol kann den beiden Dipeptide IW und WL zugeordnet werden. Andere Aminosäurenkombinationen können theoretisch ausgeschlossen

werden, da diese Peptidsequenzen nicht in den für die Säuglingsnahrungen verwendeten Molkenproteinen vorkommen. So ist LW beispielsweise nur im α -Lactalbumin aus Humanmilch zu finden (Position 59-60), während IW im bovinen α -Lactalbumin die Position 59-60 einnimmt. WI liegt nur im α_{s2} -Casein vor und sollte daher nicht in den Proben enthalten sein. Zur Bestätigung der Zuordnung wurde eine RP-HPLC der vier Peptiden IW, WL, LW und WI durchgeführt. Das entsprechende Chromatogramm ist in Abbildung 4.3-4 dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, dass die Peptide, bis auf WI und WL getrennt voneinander eluieren und weder LW noch WI in der HA-Nahrung detektiert werden konnten.

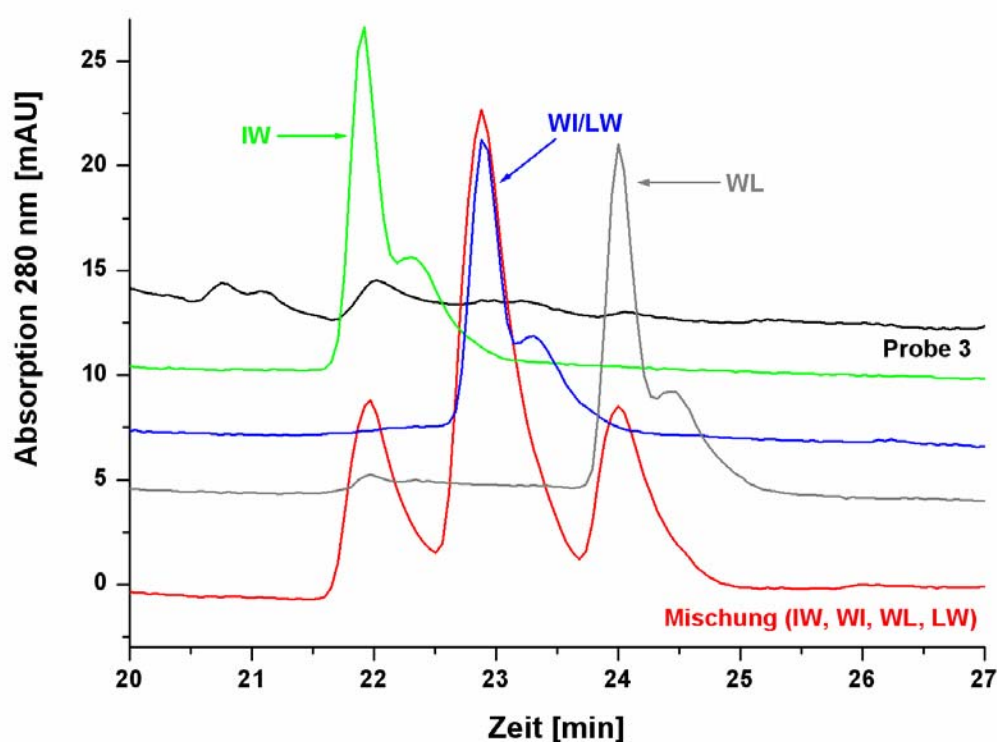


Abbildung 4.3-4: LC-Chromatogramm der hypoallergen Säuglingsnahrung Probe 3 sowie der Standard-Peptide IW, WL, WI und LW und deren Mischung; Detektion $\lambda = 280$ nm

Zur eindeutigen Ermittlung der Elutionsreihenfolge von IW und WL, wurden weitere Untersuchungen mit Standard-Peptiden und Auftrennung mittels RP-HPLC sowie anschließender Fluoreszenzdetektion durchgeführt. Dies ist für die anschließende Quantifizierung sowie für Aussagen zum Einfluss dieser Verbindungen auf das Gesamtinhibierungspotential der HA-Nahrungen nötig. Der IC_{50} -Wert ist für beide Peptide sehr niedrig (IW = $0,7 \mu\text{M}$; WL = $10 \mu\text{M}$), doch von IW ist eine mehr als 10-fach geringere Konzentration ausreichend, um ACE 50% in seiner Aktivität zu hemmen. Abbildung 4.3-5 zeigt den Ausschnitt des Fluoreszenzchromatogrammes der Probe 3 sowie den IW-Standard.

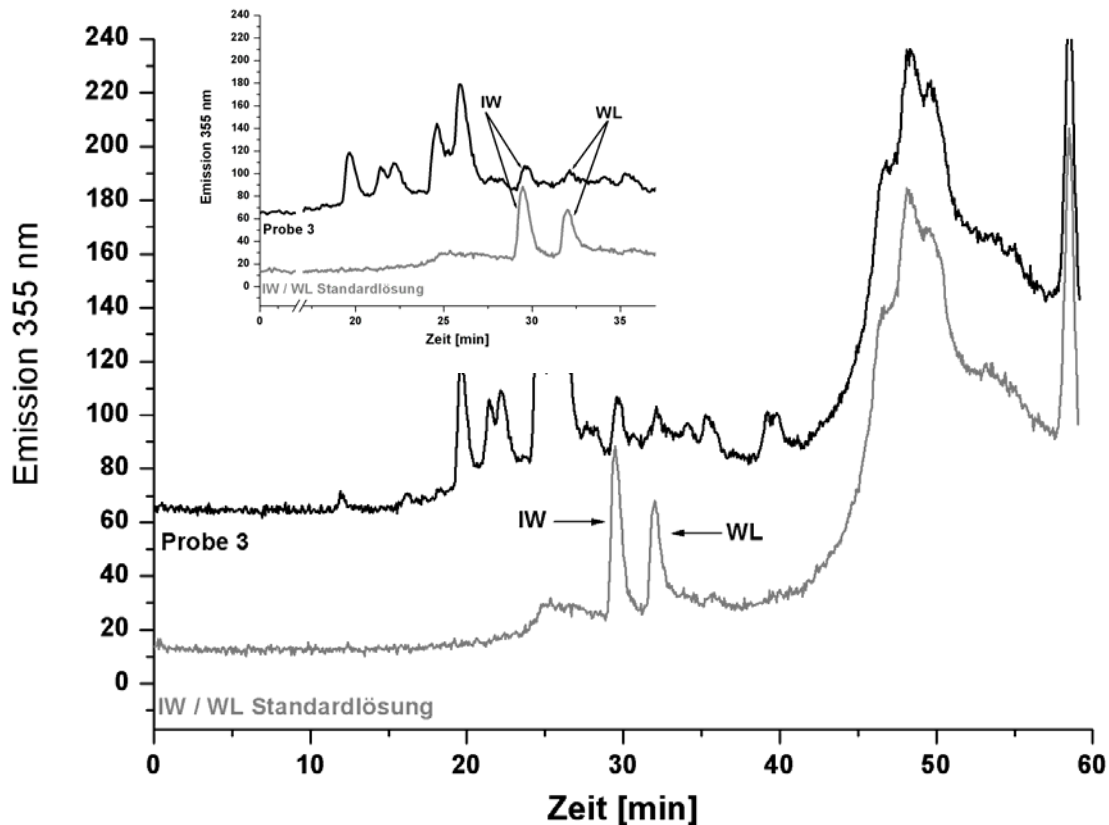


Abbildung 4.3-5: RP-HPLC-Chromatogramm der hypoallergen Säuglingsnahrung Probe 3; Fluoreszenzdetektion $\lambda_{em} = 355 \text{ nm}$ und $\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$

Damit konnte die genaue Zuordnung erfolgen. WL eluiert über eine Minute später als IW (siehe Abbildung 4.5-3).

Eine weitere Möglichkeit die Richtigkeit der Aminosäuresequenz des Dipeptids mit der ermittelten molaren Masse von 317,2 Da zu bestätigen, kann anhand der Bestimmung des N-Terminus erfolgen. Dabei wird dieser mit Dansylchlorid derivatisiert und somit werden fluoreszierende Derivate gebildet. Nach anschließender Säurehydrolyse können die entstandenen Dansyl-Derivate mittels RP-HPLC getrennt und bei $\lambda = 254 \text{ nm}$ detektiert werden (Hearn, 1991). Zur exakten Identifizierung der Dansyl-Aminosäuren war es zunächst nötig verschiedene Aminosäuren zu derivatisieren und zu vermessen. Die detaillierten Versuchsbedingungen sind in Kapitel 3.7.3 vorgestellt. Da bei dieser Analyse möglichst das Peptid isoliert vorliegen sollte, wurde im Vorfeld eine Fraktionierung der HA-Säuglingsnahrung HA3 durchgeführt (siehe Kapitel 5.). Mit Hilfe des Standardpeptides konnte eine Eingrenzung des Retentionsbereiches (in diesem Fall Fraktion 9) getroffen werden, dennoch war eine weitere Fraktionierung nötig (Parameter siehe 3.7), damit das

Peptid möglichst isoliert vorliegt. Die erhaltene Fraktion wurde ebenfalls mittels LC-ESI-TOF-MS untersucht und deren Ergebnisse in der Abbildung 4.3-5 dargestellt.

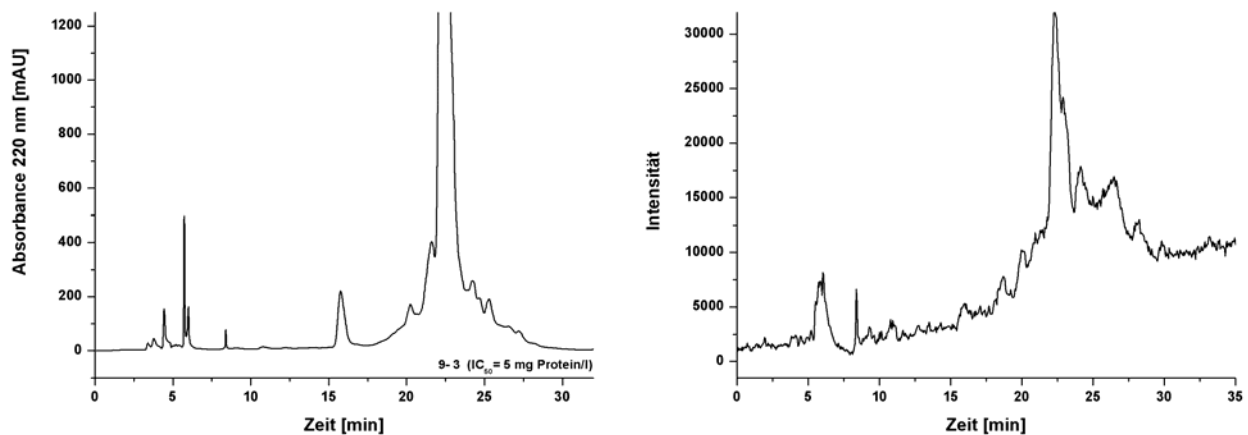


Abbildung 4.3-5: RP-HPLC-Chromatogramm (Detektion $\lambda = 220$ nm) sowie das dazugehörige TIC-Chromatogramm der Unterfraktion 9-3 der Probe HA3

Trotz der wiederholten Auftrennung war auch hier eine Isolierung des Einzelpeptides IW ($R_t = 22,4$ min) nicht möglich. Weitere Peaks konnten chromatographisch detektiert werden. Dass es sich bei dem Hauptpeak in dieser Unterfraktion um IW handelt, wurde durch Vergleich der Retentionszeiten, UV- und Massenspektrum mit dem Standardpeptid abgesichert. Dennoch wurde eine weitere Analyse zur eindeutigen Identifizierung von IW durchgeführt. Der N-Terminus des Peptids wurde mittels Dansylchloridderivatisierung bestimmt. Bei dieser Methode werden die α -Amino- sowie Iminogruppen der Peptide im alkalischen Medium mit Dansylchlorid derivatisiert. Die fluoreszierenden Dansyl-Peptide können entweder direkt mittels RP-HPLC aufgetrennt und identifiziert werden, oder nach Säurehydrolyse werden die entsprechenden Dansylaminosäuren ermittelt. Allerdings muss beachtet werden, dass Tryptophan säurelabil ist und daher nach Derivatisierung keine Säurehydrolyse erfolgen kann. Neben der Fraktion wurden ebenfalls die beiden Standardpeptide IW und WL derivatisiert und direkt mittels RP-HPLC vermessen. Die erhaltenen Chromatogramme sind in Abbildung 4.3-6 zu sehen.

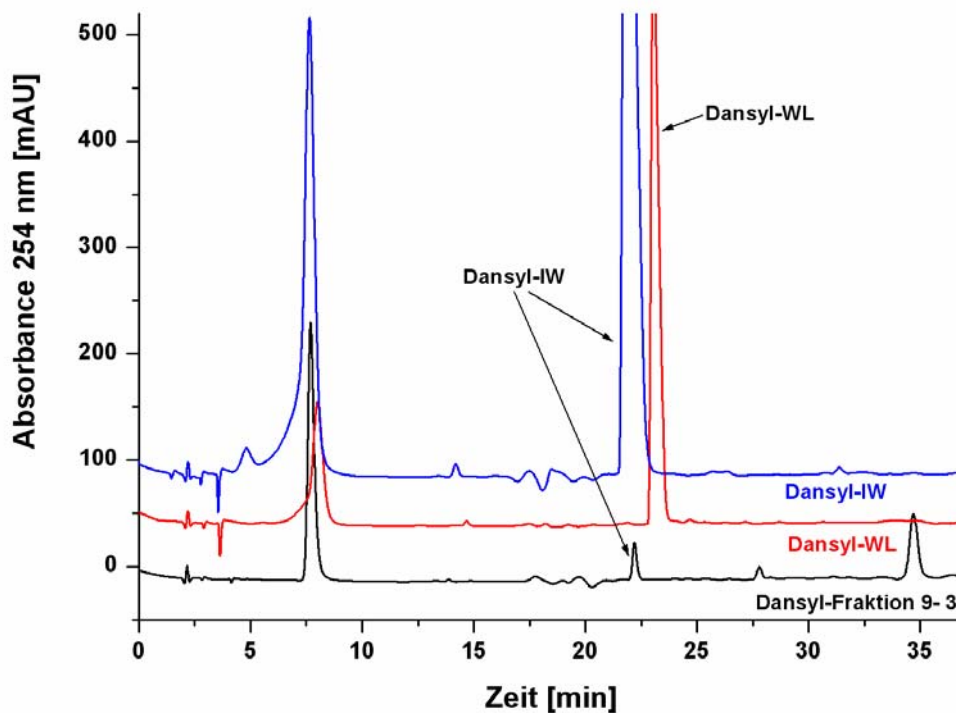


Abbildung 4.3.2-6: RP-HPLC-Chromatogramm der unhydrolysierten Dansylderivate der Unterfraktion 9-3, sowie die dansylierten Standardpeptide IW bzw. WL; Detektion $\lambda = 220$ nm

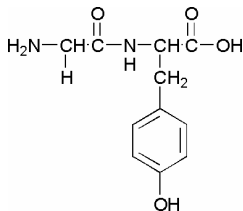
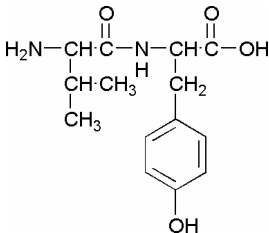
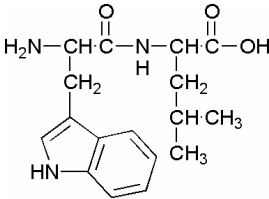
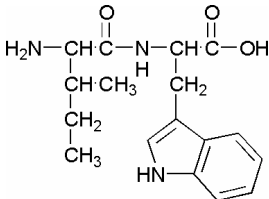
Es zeigte sich, dass IW in der Fraktion enthalten ist, WL dagegen konnte in dieser nicht nachgewiesen werden, da es durch die mehrmalige Fraktionierung offensichtlich abgetrennt wurde. Mit diesen verschiedenen Identifizierungsmethoden konnte IW zum ersten Mal in einem kommerziell erhältlichen Milchprodukt nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis wird noch bedeutender, wenn man bedenkt, dass IW ein extrem starkes ACE-inhibierendes Potential ($IC_{50} = 0,7 \mu M$) zeigt und eine Resorption im Gastrointestinal-Trakt sehr wahrscheinlich erscheint. Um weitere Aussagen über mögliche hypotensive Effekte dieses Lebensmittels treffen zu können, ist es wichtig in welchen Gehalten die Inhibitoren vorliegen. Dazu war eine Quantifizierung nötig, die im nachfolgenden Kapitel, unter anderem auch für weitere Peptide, erläutert wird.

4.4 Quantifizierung ACE-inhibierender Peptide in hypoallergenem Säuglingsnahrungen

Nicht nur die beiden tryptophanhaltigen Peptide wurden quantifiziert, sondern auch weitere ausgewählte, für die erwartet wurde, dass sie auf Grund ihres Hemmvermögens sowie ihres Gehaltes in den Nahrungen einen Großteil zu der Gesamtinhibition der jeweiligen HA-

Nahrung beitragen. Es handelt sich dabei um die in Tabelle 4.4-1 mit den entsprechenden ermittelten IC_{50} -Werten dargestellten Peptide.

Tabelle 4.4-1: Darstellung der für die Quantifizierung ausgewählten Peptide, Struktur sowie IC_{50}

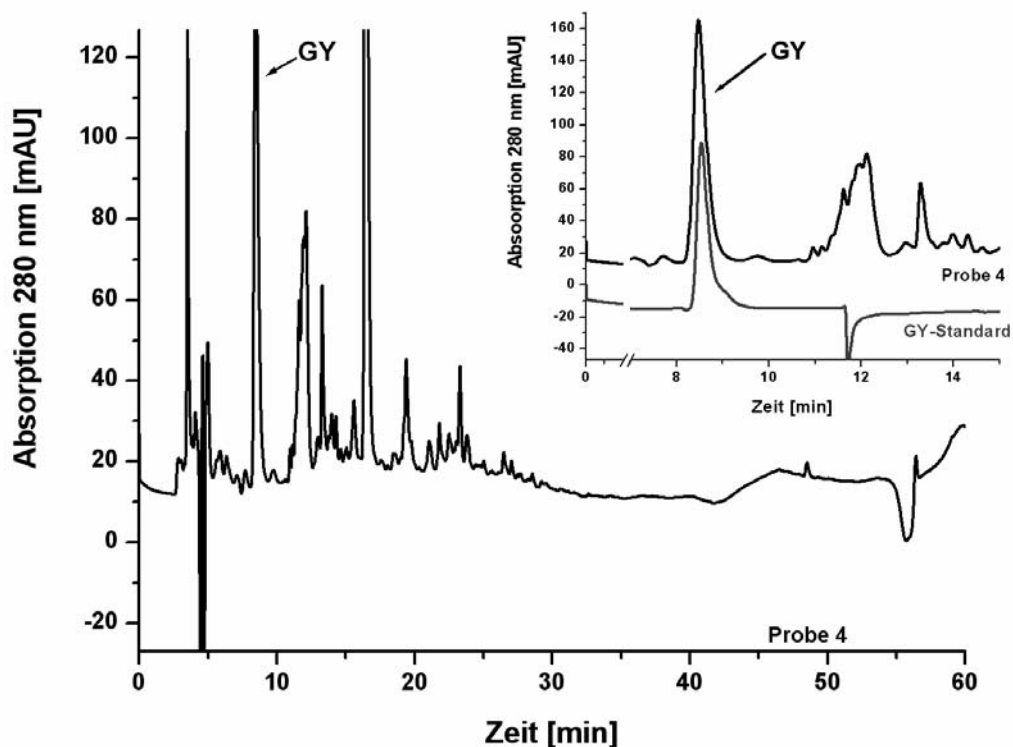
Name	Struktur	IC_{50} [μM]
GY		180 ± 20
VY		26 ± 7
WL		10 ± 2
IW		$0,7 \pm 0,3$

Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der RP-HPLC und externer Kalibrierung über die Standard-Peptide. Die Nahrungen wurden vor den Analysen einer Probenvorbehandlung unterzogen, die zunächst die Entrahmung und anschließende Abtrennung des intakten Restproteins sowie sehr großen Peptide durch Fällung mit Acetonitril umfasste. Dadurch kam es zu veränderten Proteingehalten des Untersuchungsmaterials. Da dieser aber für eine exakte Quantifizierung nötig ist, wurde der jeweilige Proteingehalt nach der Probenvorbereitung für jede Probe mittels Kjeldahl-Methode (siehe Kapitel 3.8) neu ermittelt. Die ursprünglichen sowie die nach Prozessierung erhaltenen Gehalte sind in Tabelle 4.4-2 dargestellt.

Tabelle 4.4-2: Proteingehalte der HA1-Proben vor und nach der Probenvorbereitung

Probe (HA1-Nahrung)	Proteingehalt [g/100 g Probenmaterial]	
	ursprünglich	nach Probenvorbehandlung
1	11,5	20,7
2	11,5	20,1
3	11,7	21,7
4	11,6	24,4
5	11,5	18,3
6	11,4	22,1
7	11,4	17,8

Es wurden je nach zu bestimmendem Peptid verschiedene RP-HPLC-Parameter gewählt. Während die Gehalte von GY und VY mittels UV-Detektion bei 280 nm ermittelt wurden, geschah die Quantifizierung der tryptophanhaltigen Peptide neben der UV-Detektion auch mittels Fluoreszenzdetektion ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 355 \text{ nm}$), womit trotz der komplexen Matrix der Proben eine eindeutige Quantifizierung möglich war. Abbildung 4.4-1 zeigt ein RP-HPLC-Chromatogramm der Probe 4, in der ein relativ hoher Gehalt an GY bestimmt werden konnte, sowie eine Auftrennung des Standardpeptides unter gleichen Bedingungen.

Abbildung 4.4-1: RP-HPLC-Chromatogramm der hypoallergenischen Säuglingsnahrung Probe 4; UV-Detektion $\lambda = 220 \text{ nm}$

Analog konnte das Dipeptid VY in zwei HA-Proben nachgewiesen und quantifiziert werden. Eine Coelution anderer Verbindungen konnte für alle Peptide mittels UV-Spektren-Vergleich, sowie LC-ESI-TOF-MS-Untersuchungen ausgeschlossen werden.

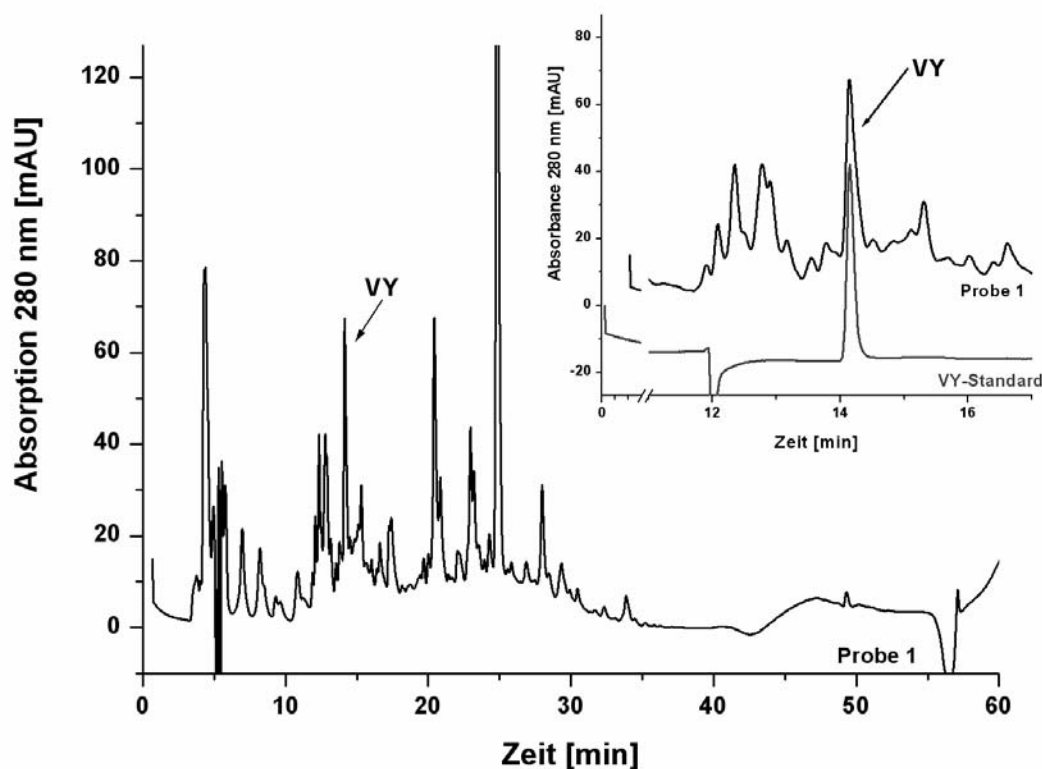


Abbildung 4.4-2: RP-HPLC-Chromatogramm der hypoallergenen Säuglingsnahrung Probe 1; UV-Detektion $\lambda = 220 \text{ nm}$

Wie schon oben beschrieben, war es für die tryptophanhaltigen Peptide möglich, die Quantifizierung mittels Fluoreszenzdetektion durchzuführen. Dies erwies sich besonders daher als günstig, da damit viele weitere Verbindungen aus der Matrix der HA-Nahrungen ausgeblendet werden konnten. Abbildung 4.4-3 zeigt das RP-HPLC-Chromatogramm der Probe 3 sowie eine Mischung der beiden Standard-Peptide IW und WL. Damit kann deutlich gezeigt werden, dass die zwei Peptide isoliert aufgetrennt werden konnten und eine Quantifizierung für beide möglich war. Allerdings muss erwähnt werden, dass keine geradlinige Grundlinie vorlag und so der Fehler der Bestimmung erhöht wurde, wie schließlich unten in der Tabelle mit den Peptidgehalten anhand der Standardabweichungen zu sehen ist.

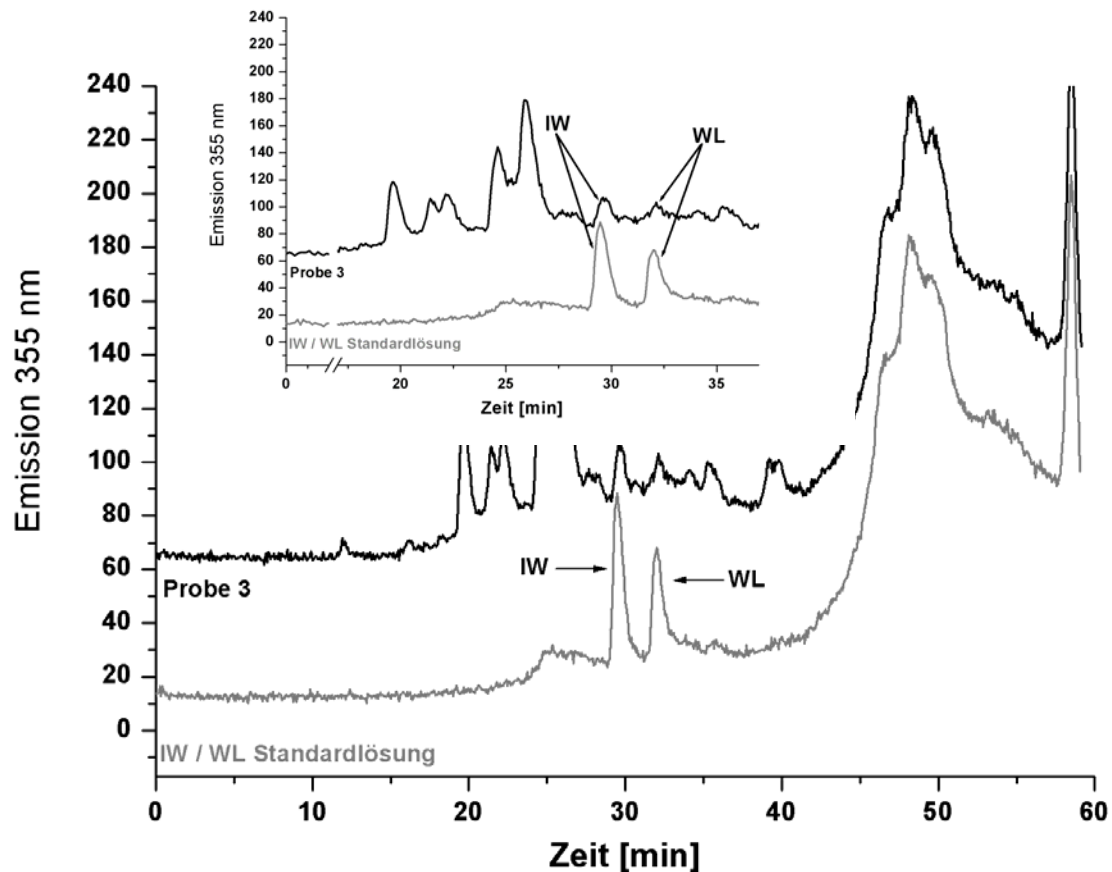


Abbildung 4.4-3: RP-HPLC-Chromatogramm der hypoallergen Säuglingsnahrung Probe 3 sowie eine Mischung der beiden Standardpeptide IW und WL (je 10 µM); Fluoreszenzdetektion $\lambda_{em} = 355$ nm und $\lambda_{ex} = 280$ nm

Nachfolgende Tabelle zeigt die einzelnen Gehalte des jeweiligen Peptides (nach Dreifachbestimmung) in den HA-Nahrungen und deren IC_{50} -Wert.

Tabelle 4.4-3: Gehalte der Peptidinhibitoren in den jeweiligen HA-Nahrungen sowie deren IC_{50} -Wert

Probe	GY [µg/g Protein] ($IC_{50} = 180$ µM)	VY [µg/g Protein] ($IC_{50} = 26$ µM)	WL [µg/g Protein] ($IC_{50} = 10$ µM)	IW [µg/g Protein] ($IC_{50} = 0,7$ µM)	IC_{50} Probe [mg Protein/l]
1	n. d.	4900 ± 460	510 ± 172	130 ± 50	104
2	n. d.	4700 ± 893	628 ± 294	500 ± 58	22
3	5400 ± 699	n. d.	285 ± 25	650 ± 69	30
4	27900 ± 2243	n. d.	233 ± 35	290 ± 50	95
5	n. d.	n. d.	492 ± 68	860 ± 98	77
6	n. d.	n. d.	281 ± 69	ca. 100	20
7	n. d.	n. d.	58 ± 12	n. d.	428

Die Dipeptide IW bzw. WL konnten nicht in allen HA-Säuglingsnahrungen bestimmt werden. Zwar könnten diese vorhanden sein, doch würden die Gehalte unter der Bestimmungsgrenze von 150 µg/g Protein liegen und wären so für einen Einfluss auf den Gesamtinhibierungseffekt der Probe irrelevant. GY sowie VY konnten nur in je zwei Proben bestimmt werden, während IW mit Ausnahme von Probe 6 und 7 in allen Proben bestimmbar war. Auch die Gehalte unterscheiden sich sehr deutlich. Für die beiden tyrosinhaltigen Peptide wurden durchschnittlich 10fach höhere Konzentrationen ermittelt als für die tryptophanhaltigen. Dies kann auf der Grundlage der relevanten Proteinsequenzen und dem daraus ableitbaren maximalen Vorkommen der Peptide in den Molkenproteinen erklärt werden. Die genannten Peptide kommen nur in den Hauptproteinen der Molke, dem α -Lactalbumin (α -La) und dem β -Lactoglobulin (β -Lg) vor. Die hohen Gehalte von GY könnten u. a. damit erklärt werden, dass dieses Peptid zweimal im α -La, an Position 17-18 und 35-36, vorhanden ist. Allerdings liegt VY, welches in ähnlichen Konzentrationen in Probe 1 und 2 gefunden wurde, nur einmal im β -Lg an Position 41-42 vor. Der Anteil am β -Lg im Molkenprotein beträgt ca. 50-56 %, der von α -La etwa 20-25 %. Daher können auch, obwohl nur einmal im Protein vorkommend, höhere Gehalte an VY resultieren. WL, das in deutlich geringeren Mengen vorliegt, könnte ebenso wie GY zweimal aus dem α -La (Position 104-105 und 116-117) freigesetzt werden, IW (59-60 α -La) dagegen nur einmal. Somit kann allein anhand der Häufigkeit der Peptide im Ursprungprotein keine Erklärung über die stark unterschiedlichen Gehalte abgegeben werden. Damit müssen die für die Herstellung der Hydrolysate verwendeten Enzyme eine wichtige Rolle spielen, sowie auch die Tertiärstruktur des jeweiligen Proteins bzw. auch die „benachbarten“ Aminosäuren der jeweiligen Peptide. Es ist davon auszugehen, dass die Verdauungsenzyme bestimmte Aminosäuresequenzen bevorzugt umsetzen und somit die entsprechenden Peptide zuerst freisetzen bzw. intramolekulare Bindungen eine Knüpfung an das Enzym und damit eine Hydrolyse erschweren. Da die Hersteller allerdings keine Angaben über die technologische Prozessführung ihrer eingesetzten Hydrolysate preisgeben, kann in diesem Fall nur gemutmaßt werden, welche Enzyme für die Herstellung der Molkenproteinhydrolysate eingesetzt wurden. Nähere Untersuchungen dazu sind im nachfolgenden Kapitel beschrieben und diskutiert. Trotz der geringen Gehalte von WL und IW sind diese beiden Peptide, besonders IW, von höherem Interesse, da deren ACE-hemmendes Potential deutlich stärker ist als das von GY und VY und die tryptophanhaltigen Peptide auch in allen Nahrungen – wenn auch in unterschiedlichen Konzentration – nachgewiesen werden konnten. IW ist bisher in Milchprodukten bzw. in Milchproteinhydrolysaten noch nicht als ACE-Inhibitor identifiziert worden und das obwohl es ein enormes Hemmungspotential aufweist, so dass physiologische Konsequenzen bei einer

täglichen Aufnahme nicht auszuschließen ist. So wurden für die Proben 1 bis 5 IW-Gehalte zwischen 130 – 860 µg/ g Protein ermittelt. Wie schon oben erwähnt liegt das Dipeptid nur einmal in der Sequenz des α -La vor. Es könnten also rein theoretisch Konzentrationen von maximal 4,5 mg IW pro g Molkenprotein freigesetzt werden. Dabei wird davon ausgegangen, dass α -La 20% des Molkenproteins ausmacht. Es konnten demnach nur 3 – 9% des maximal möglichen Gehaltes an IW in den hypoallergenischen Säuglingsnahrungen ermittelt werden. Dies lässt darauf schließen, dass eine unvollständige Hydrolyse stattgefunden hat, bzw. das Dipeptid während der Prozessführung der Hydrolyse zum Teil durch die verwendeten Proteasen zu Isoleucin und Tryptophan gespalten wurde.

Die unterschiedlichen Gehalte an IW und auch den anderen Peptiden können allerdings nicht die unterschiedlichen Hemmungspotentiale der jeweiligen Säuglingsnahrung erklären. Tabelle 4.4-4 zeigt die ermittelten Gehalte an GY, VY, LW sowie IW beim IC_{50} -Wert der entsprechenden Probe. Für Probe 1 sind 104 mg Protein/l zur 50%igen ACE-Hemmung nötig. 104 mg Protein/l dieser Probe entsprechen einer Konzentration an IW von 0,014 mg/l. Von IW wären jedoch 0,2 mg/l nötig, um allein die 50%ige ACE-Hemmung zu erreichen. Auch die anderen beiden Peptide VY und WL, die ebenfalls in dieser Probe quantifiziert werden konnten, sind nicht in den Mengen vorhanden, um die Hemmwirkung der Probe zu erklären. Dies gilt für alle untersuchten Proben, wie der Tabelle 4.4-4 entnehmen ist.

Tabelle 4.4-4: Gehalte des jeweiligen Peptides am IC_{50} -Wert der entsprechenden HA-Probe

	Gehalt am IC_{50} [mg/l]				
Probe	GY (IC_{50}= 43 mg/l)	VY (IC_{50}= 7 mg/l)	WL (IC_{50}= 3 mg/l)	IW (IC_{50}= 0,2 mg/l)	IC_{50} Probe [mg Protein/l]
1	-	0,510	0,052	0,014	104
2	-	0,103	0,014	0,011	22
3	0,162	-	0,009	0,021	30
4	2,651	-	0,022	0,023	95
5	-	-	0,038	0,067	77
6	-	-	0,056	-	20
7	-	-	0,025	-	428

Auch eine Korrelation zwischen den Inhibitorgehalten und dem Hemmungspotential ist nicht zu sehen. Für die Proben 1-4 liegt der Gehalt an IW am IC_{50} der jeweiligen Probe zwischen 0,011 und 0,023 mg/l. Diese Werte liegen ebenfalls signifikant niedriger als die für eine

50%ige ACE-Hemmung nötige Konzentration von 0,2 mg/l. Probe 5 zeigt den höchsten Gehalt an IW, jedoch wurde für die HA-Nahrung im Vergleich mit den anderen HA-Nahrungen nur eine mittlere ACE-Hemmung ermittelt. Die bestimmte Menge an IW von 0,067 mg/l kann hier einen Großteil der Gesamtinhibierung erklären. Dennoch lässt diese Auswertung erkennen, dass die quantifizierten Peptide alleine nicht die komplette ACE-Inhibierung der HA-Nahrungen verursachen. Demnach müssen in der komplexen Probenmatrix noch weitere hemmende Verbindungen vorliegen

4.5 Studien zum Einfluss der Herstellung von Molkenproteinhydrolysaten auf den ACE-hemmenden Effekt

In diesem Kapitel sollen die Auswirkungen der Herstellung der Molkenproteinhydrolysate auf die ACE-Hemmung untersucht werden. Ziel dieser Modellversuche ist es, Erklärungsansätze für die Schwankungen der IC_{50} -Werte der untersuchten HA-Nahrungen zu erhalten. Dabei ist zu beachten, dass auch der Ursprungszustand der eingesetzten Proteine eine enorme Rolle für den Hydrolyseverlauf und die daraus resultierenden Peptide sowie deren Endkonzentrationen im Produkt spielt. So kann beispielsweise eine Hitzebehandlung der Proteine und damit verbundenen Denaturierungsvorgang zum Verlust von Tertiär- und Sekundärstruktur führen und die Hydrolyse bestimmter Peptide erleichtern. Die Spaltung von Disulfidbrücken, die häufiger im α -Lactalbumin vorliegen, erleichtert z. B die Angreifbarkeit durch Proteasen an dieser bzw. der anliegenden Stelle.

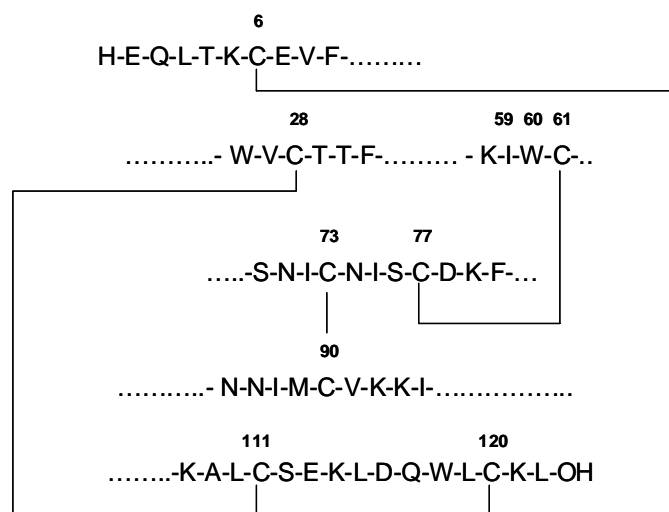


Abbildung 4.5-1: Ausschnitt der Primärstruktur von α -Lactalbumin mit Cysteinbrücken (modifiziert nach Sienkiewicz, 1981)

Damit könnten sich beispielsweise die unterschiedlichen IW-Gehalte erklären lassen. In der Sequenz von α -Lactalbumin liegt Cystein genau an Position 61, also direkt neben IW (vgl. Abbildung 4.5-1). Die Cysteinbrücken im α -Lactalbumin bestehen zwischen den Aminosäureresten in den Positionen 6-120; 28-111; 61-77 und 73-91 (*Sienkiewicz, 1981*). Daher ist mit einer erschwerten Freisetzung von dem Dipeptid zu rechnen, solange die Disulfidbrücke intakt vorliegt. Auch die Wahl der Enzyme und Dauer der Verdauung, sowie mögliche chemische Modifikationen, die während einer Lagerung ablaufen können, spielen eine bedeutende Rolle. Da seitens der Hersteller keine Angaben über die Prozessführung ihrer verwendeten Molkenproteinhydrolysate vorlagen bzw. auch nicht in Erfahrung gebracht werden konnten, wurde im Rahmen von Modelluntersuchungen in Anlehnung an das Patent EP 1 063 873 A1 vorgegangen (*Bindels et al., 2000*). Dieses Patent wurde direkt als Vorschlag zur Molkenproteinhydrolysatherstellung, die auch in HA-Nahrungen eingesetzt werden, angegeben. Die Hydrolyse verläuft enzymatisch, wobei die drei Enzyme Trypsin, Alcalse® und Flavourzyme® eingesetzt werden. Trypsin als Endopeptidase spaltet dabei bevorzugt Peptidbindungen, an denen Lysin oder Argin am C-terminalen Ende vorliegen. Dagegen kommt es nicht zur Hydrolyse, wenn die Aminosäure Prolin involviert ist. Alcalse® ist eine Mischung aus Endo- und Exopeptidasen, die aus *Bacillus licheniformis* gewonnen werden. Diese zeichnen sich durch eine breite Substratspezifität aus, allerdings konnte gezeigt werden, dass eine bevorzugte Umsetzung erfolgt, wenn an der Peptidbindung C-terminal hydrophobe Aminosäuren, wie Phenylalanin, Valin oder auch Leucin vorliegen (*Ducet et al. 2003*). Auch das Flavourzyme ist eine Mischung aus Endo- und Exopeptidasen, es wird allerdings durch Fermentation einer bestimmten Stammkultur des *Aspergillus oryzae* gebildet. Diese Enzymmischung ist auch für die Hersteller von Molkenproteinhydrolysaten von besonderem Interesse, da sie die Freisetzung sogenannter Bitterpeptide, die durch hydrophobe Aminosäuren wie Tryptophan, Tyrosin oder Leucin entstehen, vermeidet und es somit zu einer geringeren geschmacklichen Beeinträchtigung kommt. Die Autoren geben keinen exakten Ablaufplan für die Hydrolyse an sondern nur Empfehlungen, die im Detail im Kapitel 3.6 beschrieben sind. So wird beispielsweise vorgeschlagen, die Hydrolyse einstufig bzw. mehrstufig durchzuführen. Während bei dem einstufigen Verdau alle drei Enzyme gleichzeitig zugegeben werden, geschieht dies bei dem mehrstufigen Prozesse nacheinander. Untersuchungen diesbezüglich konnten keinen Unterschied bezüglich der ACE-Hemmung und dem Hydrolysegrad, welcher mittels GPC bestimmt wurde, feststellen. Für die nachfolgenden Studien wurde deshalb nur der einstufige Prozess durchgeführt, da anzunehmen ist, dass auch die Hersteller diesen auf Grund des geringeren Arbeitsaufwandes bevorzugt anwenden. In diesen Studien wurden ein Molkenproteinpulver (Milei60) der Firma

Milei verwendet, welches -laut Herstellerangaben- hauptsächlich aus 25% Lactose und 60% Protein besteht, wobei 60,2% dem β -Lactoglobulin und 20,3% dem α -Lactalbumin entsprechen. Schließlich wurde der Hydrolyseverlauf über 48 Stunden mittels GPC verfolgt sowie jeweils die ACE-Hemmung des entsprechenden Produktes untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse werden nachfolgend dargelegt und diskutiert.

4.5.1 Charakterisierung des Hydrolyseverlaufs eines Molkenpulvers mittels GPC

In den durchgeführten Studien wurde eine 10fach geringere Enzymkonzentration, als im Patent EP 1 063 873 A1 angegeben, verwendet, da der Verlauf der Hydrolyse charakterisiert werden sollte, dieser aber bei der empfohlenen Enzymmenge zu schnell ablaufen würde. Dies zeigt beispielsweise der Blindwert, der mitgeführt wurde. Obwohl sofort nach Enzymzugabe die Proteinlösung für zehn Minuten bei 100°C gehalten wurde, um die Enzyme zu inaktivieren, reicht die extrem kurze Inkubationszeit, bis die 25 ml der Lösung die Denaturierungstemperatur erreicht haben, aus um einen Verdau der Molkenproteine anteilig herbeizuführen. Zunächst soll der Verlauf der Hydrolyse dargestellt werden. Das Ausmaß der enzymatischen Verdauung wurde, wie auch in der Industrie üblich, mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) und UV-Detektion bei 220 nm und 280 nm bestimmt.

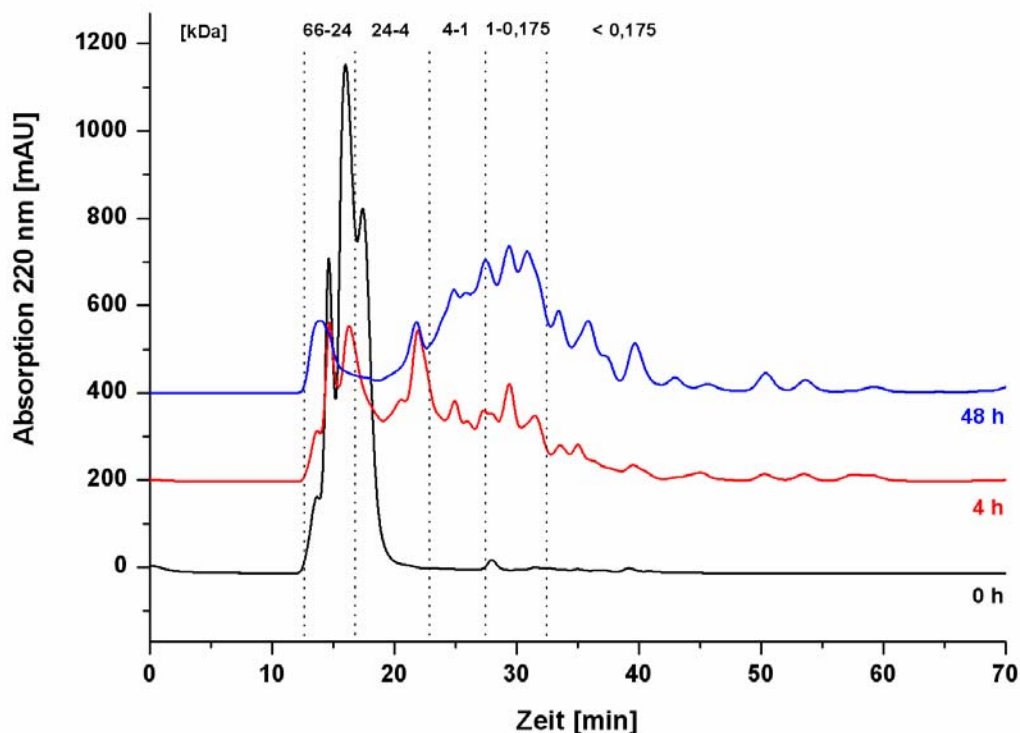


Abbildung 4.5.1-1: GPC-Chromatogramme der Molmassenverteilung des nativen (0 h) sowie des hydrolysierten Molkenproteins nach 4 h und 48 h Inkubationszeit

Für eine Charakterisierung der Verteilung der Molmassen wurden die Chromatogramme in fünf Abschnitte eingeteilt (siehe auch Kapitel 4-2), deren Bereiche in den jeweiligen Abbildungen gekennzeichnet sind. Schon nach sehr kurzer Hydrolysezeit von nur zehn Minuten ist ein relativ starker Abbau der Molkenproteine erkennbar, der sich im Laufe des enzymatischen Verdaus kontinuierlich fortsetzt, doch selbst nach 48 Stunden nicht zu einer vollständigen Hydrolyse führt. Den größten Anteil nimmt schließlich nach 48 Stunden enzymatischer Verdauung nicht der Bereich $< 0,175$ kDa, in dem vorwiegend freie Aminosäuren vorliegen, ein sondern Verbindungen mit einer molaren Masse zwischen 1 und 0,175 kDa machen den höchsten Anteil im Hydrolysat aus. Der Abbau höhermolekularer Verbindungen bzw. die Freisetzung niedermolekularer Substanzen scheint nach einer Hydrolysezeit von 24 Stunden nicht mehr so steil abzulaufen, wie in den vorhergehenden Stunden.

Tabelle 4.5.1-1: Prozentuale Flächenanteile entsprechender Molmassenbereiche der unterschiedlich lang hydrolysierten Molkenprotein-Proben

	Prozentualer Flächenanteil der entsprechenden Molmassenbereiche				
Probe	66 – 24 kDa	24 – 4 kDa	4 – 1 kDa	1–0,175 kDa	< 0,175 kDa
nativ	47,9	39,6	1,0	1,4	1,6
10 min	30,8	37,5	11,7	12,7	7,2
30 min	29,3	36,9	12,1	13,5	8,2
1 h	28,0	34,7	12,8	15,5	9,0
2 h	27,4	34,4	13,6	15,5	9,1
3 h	26,9	33,6	14,1	15,9	9,6
4 h	19,4	29,6	17,4	20,1	13,5
8 h	18,1	26,1	19,3	22,3	14,2
12 h	18,0	23,0	19,3	23,3	16,4
24 h	13,8	15,0	21,5	29,9	19,8
30 h	11,1	13,4	22,1	31,9	21,5
48 h	6,4	8,2	28,9	33,4	23,1

Um dies zu verdeutlichen wurde eine graphische Darstellung wie in Abbildung 4.5.1-2 zu sehen ist, gewählt.

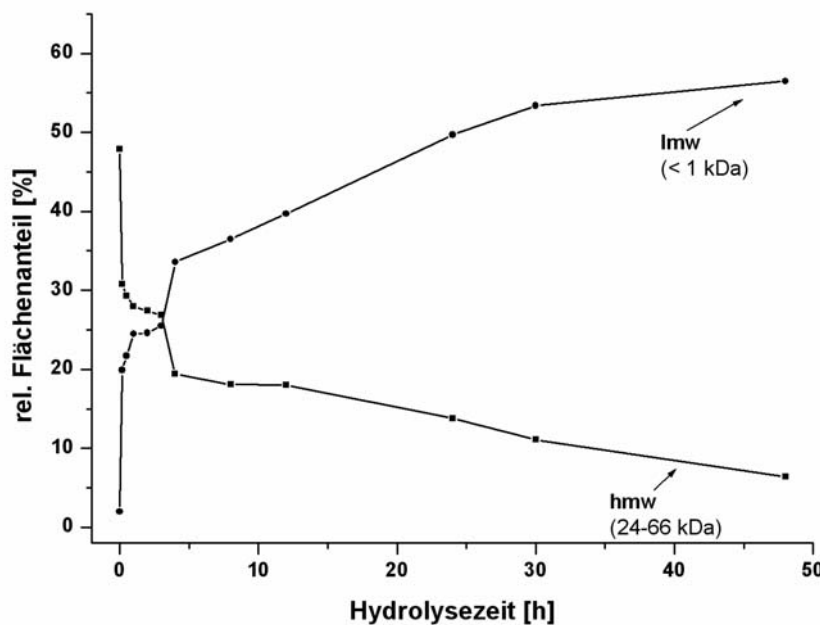


Abbildung 4.5.1-2: Zunahme der niedermolekularen (lmw) sowie Abnahme der hochmolekularen Massen (hmw) mit zunehmender Hydrolysezeit

Die stärkste Hydrolyse lief in den ersten Stunden ab. Nach vier Stunden lagen mehr als 51% der Peptide unter 4 kDa vor. Der danach folgende geringere Proteinabbau könnte u. a. damit erklärt werden, dass die Enzymaktivität herabgesetzt wurde, indem es beispielsweise auf Grund der Produktbildung zu pH-Verschiebungen kam. Möglich und auch wahrscheinlicher ist, dass es während der Hydrolyse zu Hemmung der Aktivität der Verdauungsenzyme durch die gebildeten Produkte kommt bzw. die Proteasen auf Grund von Substratmangel sich gegenseitig bzw. selbst hydrolysieren und damit inaktivieren. Damit wären die oben genannten Anforderungen an ein Molkenproteinhydrolysat, welches für den Einsatz in hypoallergen Säuglingsnahrung geeignet ist, das mindestens 50% des Proteinanteils als Peptide mit zwei bis 50 Aminosäuren vorliegen soll, nach vier Stunden enzymatischer Hydrolyse erreicht. Da hier mit Gegensatz zur Originalvorschrift mit deutlich geringeren Enzymaktivitäten gearbeitet wurde, ist davon auszugehen, dass die Vorgaben der Patentautoren mit einer Hydrolysenzeit von 1,5 bis 3 Stunden sicherlich auch diese Forderungen erfüllen. *Smyth et al. (1998)* führten ebenfalls Studien zum enzymatischen Verdau von Molkenproteinkonzentraten durch. Sie zeigten dabei, dass durch den Einsatz von Flavourzyme nach acht Stunden Inkubation ein relativ hoher Hydrolysegrad erreicht wurde. Allerdings konnten dennoch hohe Gehalte an hochmolekularen Verbindungen (> 10 kDa) nachgewiesen werden. Daraus schlussfolgerten sie, dass das Flavourzyme bevorzugt große Peptide aus den Molkenproteinen abspaltet. Des Weiteren führten sie die Hydrolyse auch mit Trypsin durch. Dabei wurde bei gleicher Inkubationszeit eine fast vollständige Hydrolyse des

Molkenproteins erreicht und gleichzeitig ein hoher Anteil an niedermolekularen Massen (< 1 kDa) erreicht. Auch für die Alcalase zeigten sie ähnliche Effekte. Im hier durchgeführten Hydrolyseansatz, sind also die beiden Enzyme Trypsin und Alcalase für den größten Teil der Freisetzung an niedermolekularen Verbindungen verantwortlich, während das Flavourzyme vielmehr „unterstützend“ wirkt.

4.5.2 Untersuchungen zur Entwicklung des ACE-hemmenden Effektes des Molkenproteinhydrolysates während der enzymatischen Hydrolyse

Nachfolgend war es von Interesse, inwieweit sich die Dauer des enzymatischen Verdaus auf das ACE-hemmende Potential der Molkenproteinhydrolysate auswirkt. Zunächst sollte ein möglicher Einfluss der eingesetzten Enzyme Trypsin, Flavourzyme und Alcalase sowie das Molkenproteinpulver selbst auf die Aktivität des ACE untersucht werden. Dafür wurden sowohl die Enzyme einzeln, in der Mischung, in der sie auch eingesetzt wurden, und eine Lösung des Molkenproteinpulvers ohne Enzymzugabe analog der Hydrolysate bei 100°C für 10 Minuten hitzebehandelt. Die Untersuchungen ergaben, dass weder die inaktivierten Enzyme, noch das Protein einen hemmenden Einfluss auf das ACE hatten. Dagegen zeigte eine Lösung des Molkenproteinpulvers und den drei Enzymen, welche sofort für 10 Minuten bei 100°C zur Inaktivierung der Enzyme erhitzt wurde, eine verhältnismäßig starke ACE-Hemmung. Offensichtlich erfolgt bereits bis zur Erreichung der Inaktivierungstemperatur, eine nicht zu vernachlässigende Hydrolyse der Molkenproteine und Freisetzung ACE-hemmender Peptide.

Tabelle 4.5.2-1: Darstellung der IC_{50} -Werte des unterschiedlich lang hydrolysierten Molkenproteins

Hydrolysezeit [h]	IC_{50} [mg Protein/l]	Hydrolysezeit [h]	IC_{50} [mg Protein/l]
0	180	4	42
0,17	176	8	90
0,5	97	12	74
1	96	24	36
2	104	30	36
3	90	48	76

Das hemmende Potential der Hydrolysate nahm innerhalb der ersten vier Stunden stetig zu, bis für das 4 h-Hydrolysat ein sehr niedriger IC_{50} -Wert von 42 mg Protein/l ermittelt wurde (vgl. Tabelle 4.5.2-1). Allerdings zeigte sich, dass der hemmende Effekt nach acht Stunden wieder abnahm, um anschließend wieder zuzunehmen (Abbildung 4.5.2-3). Es ist also davon

auszugehen, dass mit dem Fortschreiten der Proteolyse Peptid-Inhibitoren abgebaut werden und neu gebildet werden.

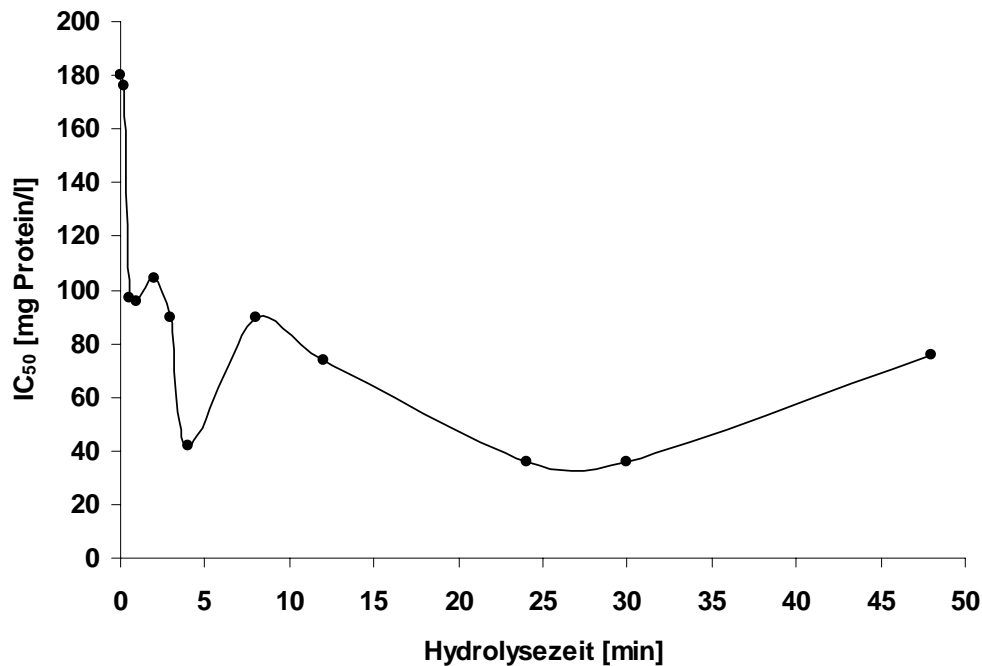


Abbildung 4.5.2-3: IC₅₀-Wert des Molkenproteinpulvers Milei60 in Abhängigkeit der Hydrolysezeit

Der Verlauf der Hydrolyse zeigt, dass durch den Abbau der Molkenproteine und den damit freiwerdenden Peptiden ein ACE-hemmender Effekt erreicht wird. Dieser ist zwar je nach Dauer der Hydrolyse unterschiedlich stark ausgeprägt, aber auch noch 48 Stunden vorhanden. An Hand der vorliegenden Daten kann gesagt werden, dass kein Endpunkt hinsichtlich der ACE-Inhibierung erreicht wird. Die Studie verdeutlicht damit, dass relativ geringe Schwankungen in der Prozessführung, als Variationen in Zeit, Temperatur, Enzymaktivitäten oder auch der Proteinqualität einen starken Einfluss auf das resultierende ACE-hemmende Potential der Molkenproteinhydrolysate haben. Dies erklärt die Unterschiede der IC₅₀-Werte der untersuchten HA-Nahrungen (vgl. Kapitel 4.1).

4.6 Untersuchungen zur Lagerung der hypoallergen Säuglingsnahrungen

Die nachfolgend diskutierten Untersuchungen sollten ebenfalls Hinweise bzw. Erklärungen für die unterschiedliche ACE-Inhibierung der HA-Nahrungen liefern. Auf Grund der komplexen Zusammensetzung der HA-Säuglingsnahrungen ist davon auszugehen, dass unterschiedliche chemische Reaktionen während der Lagerung ablaufen. Da ein hoher Gehalt an Peptiden und Lactose vorliegt, ist dabei vor allem die Maillard-Reaktion zu nennen. Dabei reagiert die Carbonylfunktion reduzierende Zucker mit der Aminokomponente von Proteinen,

Peptiden bzw. Aminosäuren. Damit könnten Peptid-Inhibitoren an Hemmvermögen verlieren, da auf Grund von sterischen Verschiebungen die Bindung am Enzym nicht mehr gewährleistet ist. Auch könnte der gegenteilige Effekt auftreten, so dass nur mäßig inhibierende Peptide auf Grund der Reaktion mit der Carbonylfunktion der Lactose eine stabilere Bindung im aktiven Zentrum des ACE hervorrufen können.

4.6.1 Untersuchungen zum Einfluss der Lagerung auf das ACE-hemmende Potential der Probe 3

Zur Bestimmung des Ausmaßes der Maillard-Reaktion konnte auf Vorarbeiten am Institut zurückgegriffen werden. Die Studien von *Penndorf et al. (2007)* zeigten einen in unterschiedlich inkubierten hypoallergenen Säuglingsnahrungen ansteigenden Gehalt verschiedener N-terminaler Amadori-Produkte, welche in der frühen Phase der Maillard-Reaktion gebildet werden. Die Bestimmung der Amadori-Produkte erfolgte über die während der Säurehydrolyse gebildeten α -N-(2-Furoylmethyl)-derivate (FMAAs). Dabei wurden die Derivate der Aminosäuren, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin und Lysin bestimmt. Diese Verbindungen wurden auch für die hier durchgeführten Lagerungsstudien als Indikator für das Ausmaß der frühen Maillard-Reaktion bestimmt. Zunächst wurden die HA-Proben nach einer 14monatigen Aufbewahrung bei 4°C, Raumtemperatur und 37°C auf ihren Gehalt an α -N-(2-Furoylmethyl)-derivate (FMAA) sowie ihren ACE-inhibierenden Effekt untersucht. Da mit dem etablierten RP-HPLC-Verfahren von *Penndorf et al. (2007)* keine ausreichende Trennung erreicht werden konnte, wurde die Methode leicht modifiziert. Die Änderungen sind im Methoden-Teil (Kapitel 3.11) dargelegt. Die Identifizierung erfolgte mittels Standardsubstanzen, die von *Penndorf et al. (2007)* hergestellt wurden. Die Quantifizierung der FMAAs fand nach externer Kalibration über einen Furosinstandard statt. Mit diesen Parametern wurden die in Tabelle 4.6.1-1 bestimmten Gehalte der Furoylmethyl-Derivate von Valin, Isoleucin und Leucin in den entsprechend gelagerten Proben erhalten. Gleichzeitig wurde der Einfluss der gelagerten HA-Nahrungen auf die ACE-Aktivität untersucht. Es wurden dabei nur die HA-Proben 1-3 exemplarisch dargestellt. Für die anderen spiegelte sich das gleiche Ergebnis wieder.

Tabelle 4.6.1-1 Vergleich unterschiedlicher Lagerbedingungen für drei HA-Proben bezüglich der ACE-Inhibierung und Gehalten der Furoylmethyl-Derivaten von Valin, Isoleucin und Leucin

	Lagerung 14 Monate	ACE-Inhibierung [%] je 100 mg Protein/l	FM-Val	FM-Ile	FM-Leu
			[μmol/g Protein]		
Probe 1	-	47	0,8	1,2	1,8
	4 °C	43	0,8	1,4	2,0
	RT	43	0,9	1,5	2,2
	37 °C	42	1,1	1,6	2,3
Probe 2	-	19	0,7	1,2	1,9
	4 °C	52	0,8	1,3	1,8
	RT	54	0,9	1,6	2,1
	37 °C	45	1,1	1,5	2,2
Probe 3	-	67	2,1	2,3	4,0
	4 °C	71	1,3	1,6	2,4
	RT	72	2,5	2,7	3,9
	37 °C	70	2,0	2,0	3,3

Die Ergebnisse zeigen, dass die Lagerung unter den gewählten Bedingungen keinen Einfluss auf das ACE-inhibierende Potential der Proben hat und auch die Maillard-Reaktion nur minimal abläuft, bzw. die FMAAs auf Grund der langen Inkubationszeit von 14 Monaten schon wieder durch Weiterreaktion abgebaut wurden. Um exaktere Aussagen über die Bildung von Furoylmethyl-Derivaten und deren möglichen Einfluss auf die ACE-Aktivität zu treffen, wurde exemplarisch für alle die hypoallergene Säuglingsnahrungen Probe 3 einer simulierten Lagerung bei einer Inkubationstemperatur von 80°C für bis zu 48 Stunden unterzogen. Die trocken gelagerten Proben sind in Abbildung 4.6.1-1 dokumentiert.

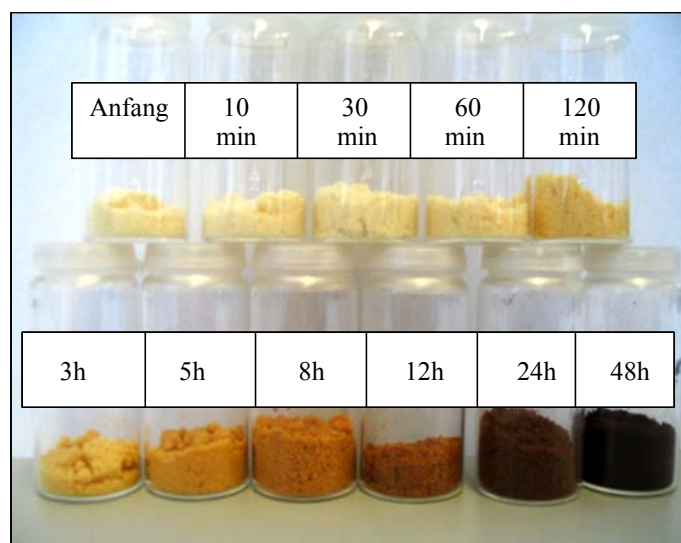


Abbildung 4.6.1-1: Farbbildung der HA-Nahrung während unterschiedlicher Inkubationszeiten bei 80°C

Rein optisch ist die deutliche Veränderung während der Lagerung zu erkennen. Schon nach 60 Minuten und noch deutlicher nach 120 Minuten war eine leichte Braun-Färbung sichtbar, die mit ansteigender Inkubationszeit zunahm, bis nach 48 Stunden nur noch schwarz gefärbte Produkte resultierten. Auch am typisch karamellartigen Geruch, der leicht schon ab 30 Minuten wahrgenommen wurde, zeigte sich der Ablauf der Maillard-Reaktion. Schon hierbei war zu erkennen, dass mit steigender Lagerung die schnell entstehenden *Amadori*-Produkte weiter zu hochreaktiven α -Dicarbonylverbindungen reagierten, welche wiederum reaktive Intermediate sind und wichtige Precursoren für aromaaktive Verbindungen sowie Bräunungsprodukte darstellen. Während der fortgeschrittenen Phase entstehen schließlich hochmolekulare Melanoidine, die die starke Braun-Schwarz-Färbung verursachen. Die Lagerproben wurden wie oben auf ihren Gehalt an FM-Val, FM-Ile und FM-Leu nach Säurehydrolyse mittels RP-HPLC untersucht und gleichzeitig wurde der Einfluss auf die ACE-Aktivität bestimmt, auf den später eingegangen wird. Die ermittelten Werte der FMAAS sind in Abbildung 4.6.1-2 graphisch dargestellt. Wie auch schon in der unbehandelten Probe wurde für FM-Leu stets der höchste Gehalt ermittelt, während FM-Val und FM-Ile meist in annähernd ähnlichen Konzentrationen vorlagen. Der Verlauf während der Lagerung war für alle drei Derivate gleich. Es wurde ein Anstieg bis zu einem Maximum nach fünf Stunden Inkubation ermittelt, bei dem die Gehalte für FM-Leu von 2 auf 17 $\mu\text{mol/g}$ Protein, für FM-Ile von 1,5 auf 11 $\mu\text{mol/g}$ Protein und für FM-Val von 1 auf 13 $\mu\text{mol/g}$ Protein anstiegen.

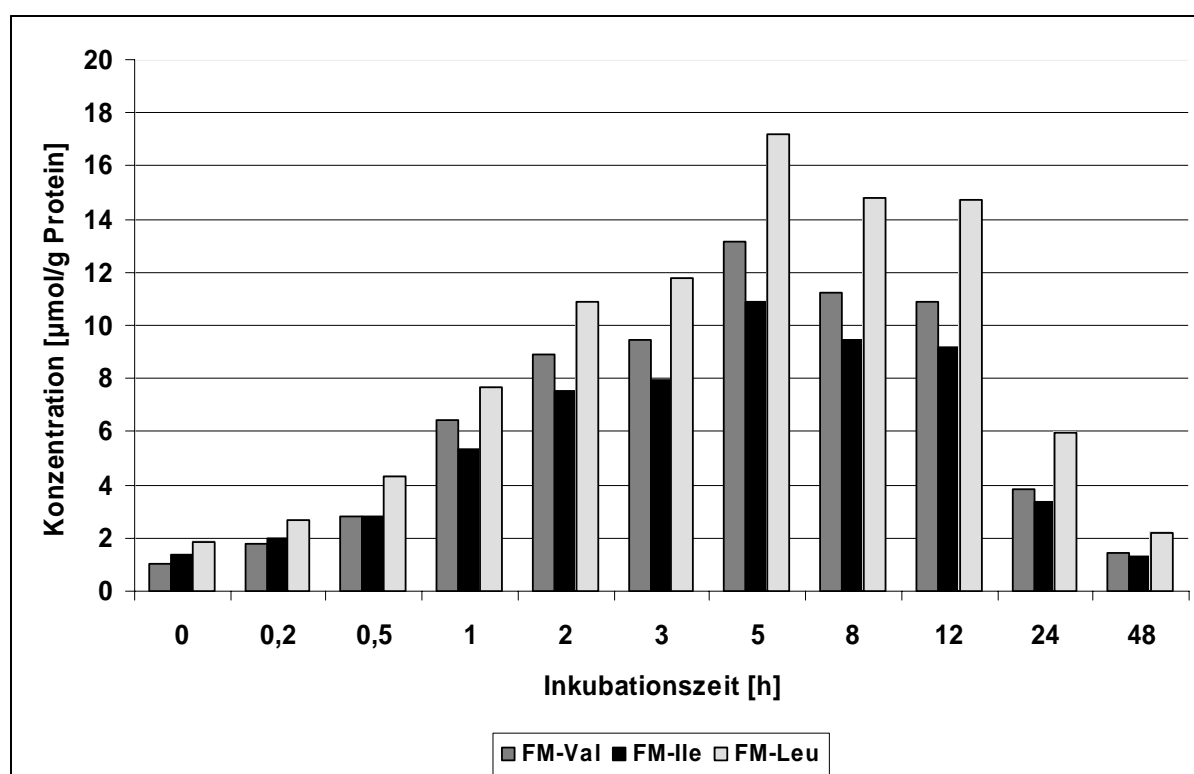


Abbildung 4.6.1-2: FMAA-Gehalte der HA-Probe 3 in Abhängigkeit der Inkubationszeit bei 80°C

Dadurch erreichten die FMAA-Konzentrationen nach fünf Stunden Inkubation einen etwa zehnfach höheren Gehalt als zu Beginn der Stresslagerung. Bei weiterführender Erhitzung überwog die Bildung von Folgeprodukten entsprechend der Phasen der *Maillard*-Reaktion, wodurch die *Amadori*-Produkte abgebaut wurden. Dies korrelierte mit der zunehmenden Braunfärbung der Proben. Schließlich wurde nach 48 Stunden ein FMAA-Gehalt ermittelt, der annähernd dem der unerhitzten Proben entspricht. Da aus den *Amadori*-Produkten neben den FMAAs gleichzeitig die enthaltenen Aminosäuren sowie weitere Verbindungen, beispielsweise Pyridosin, freigesetzt werden, wird für die Abschätzung der N-terminalen Aminosäureblockierung ein Überföhrungsfaktor genutzt. Tabelle 4.6.1-5 zeigt für die Probe 3, unbehandelt und nach fünfstündiger Lagerung bei 80°C, die mit Hilfe der Überföhrungsfaktoren bestimmten Gehalte der *Amadori*-Produkte.

Tabelle 4.6.1-1 Vergleich der FMAA-Konzentration und daraus resultierende *Amadori*-Produkt-Gehalte

	FMAA-Konzentration [µmol/g Protein]		Überföhrungsfaktor	<i>Amadori</i> -Produkt [µmol/g Protein]	
	0 h	5 h		0 h	5 h
FM-Leu	1,8	17,2	14,3	26,2	246,3
FM-Ile	1,4	10,9	15,2	20,9	165,7
FM-Val	1,0	13,2	15,9	16,5	209,4

Da bekannt ist, dass in Probe 3 ausschließlich Molkenprotein als Eiweißquelle vorliegt, kann an Hand der *Amadori*-Produkt-Bildung die Aminosäureblockierung berechnet werden. In 100 g Molkenprotein sind 11,8 g Leucin enthalten, dass heißt, dass die Blockierung dieser Aminosäure von 3 auf 27 % anstieg. Für Isoleucin (7,0 g/100 g Molkenprotein) bedeutet dies eine Erhöhung von 4 auf 31 % und bei Valin (7,5 g/100g Molkenprotein) von 3 auf 33 %. Zur Bestimmung eines möglichen Einflusses der Lagerung und der daraus resultierenden *Maillard*-Reaktionsprodukte auf die ACE-Aktivität, wurde mit den unterschiedlich erhitzten Proben der ACE-Aktivitätstest (Proteinkonzentration im Ansatz 110 mg/l) durchgeführt. Die Ergebnisse dazu sowie die Gehalte der ermittelten FMAAs sind in Abbildung 4.6.1-3 zu sehen. Die unbehandelte Probe zeigte einen sehr starken ACE-hemmenden Effekt. Mit zunehmender Inkubation bei 80°C konnte eine Verringerung des Inhibierungsvermögens festgestellt werden, welches schließlich nach 12 Stunden mit einer nur noch 37%igen Hemmung des ACEs (zu Beginn: 78% Inhibierung) den Tiefstand erreicht hatte. Zwar nahm das Hemmpotential anschließend wieder zu, allerdings nur minimal, so dass nach 48 Stunden Inkubation eine Inhibierung des Enzyms von ca. 45 % erreicht wurde.

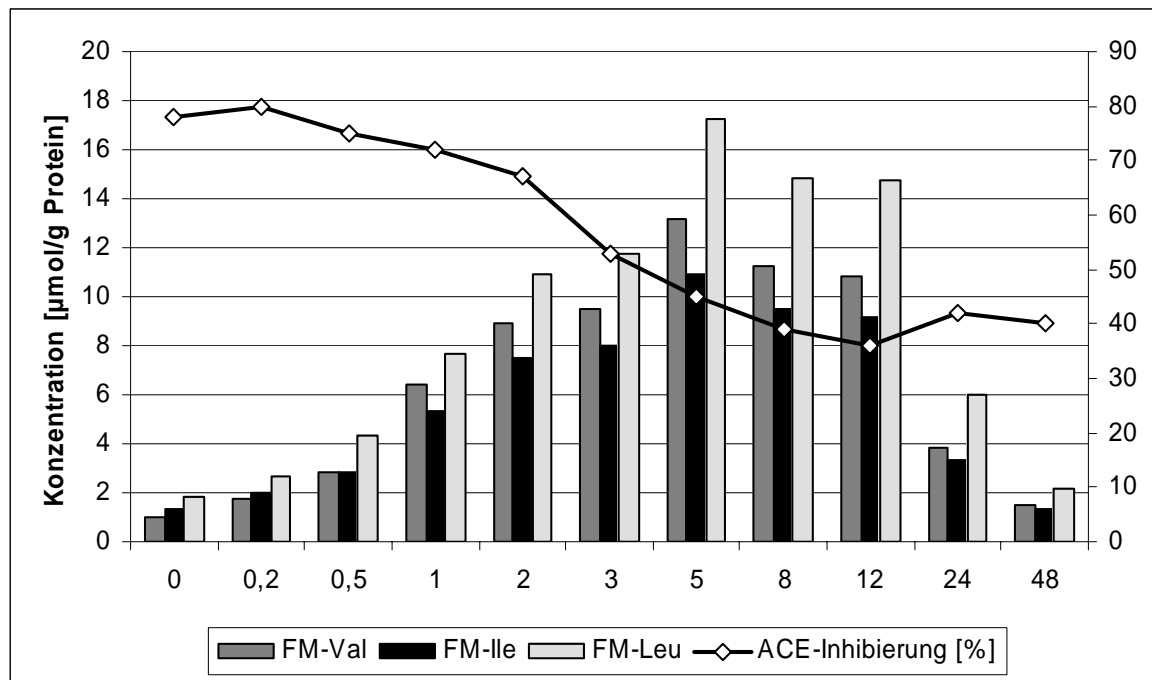


Abbildung 4.6.1-3: Gegenüberstellung der FMAA-Gehalte sowie die ACE-Inhibierung der HA-Probe 3 in Abhängigkeit der Inkubationszeit bei 80°C

Allerdings muss bei diesen Testreihen erwähnt werden, dass vor allem bei den stark gefärbten Proben auch nach mehrmaliger Ultraschallbehandlung nicht alle Bestandteile in Lösung gingen. Demnach konnte nur der lösliche Anteil im ACE-Aktivitätstest eingesetzt werden. Die Melanoidine, die auch für eine mögliche Enzymhemmung bekannt sind, nehmen auf Grund ihrer schlechten Löslichkeit daher kaum Einfluss auf das bestimmte Inhibierungsvermögen. Ein besserer Vergleich des Hemmpotentials bieten die IC_{50} -Werte an, die in Abbildung 4.6.1-4 für ausgewählte Inkubationszeiten der Probe 3 ermittelt wurden. Auch nach einer Stunde Inkubation bei 80°C zeigt sich keine Veränderung des inhibierenden Potentials, doch nach drei Stunden ist schon fast eine doppelte so hohe Proteinkonzentration nötig, um den gleichen Effekt hervorzurufen. Wie auch in Abbildung 4.6.1-3 zu sehen ist, nimmt das Hemmvermögen stetig ab. Nach 48 Stunden ist es zwar wieder erhöht, doch noch immer ist eine mehr als doppelt so hohe Proteinkonzentration wie zu Beginn der Erhitzung nötig, um die ACE-Aktivität um 50% zu reduzieren. Scheinbar werden Peptid-Inhibitoren während der Lagerung durch *Amadori*-Produkt-Bildung so modifiziert, dass eine Enzymbindung verschlechtert wird und damit auch das Hemmvermögen. Gleichzeitig scheinen allerdings auch neue Produkte gebildet zu werden, die das Inhibierungspotential wieder erhöhen, denkbar wäre z.B. das Maltol. Des Weiteren ist nicht auszuschließen, dass Peptide die zunächst mäßige Hemmwirkung zeigten, eine erhöhte Inhibierung hervorrufen, da durch den Lactoserest spezifische Bindungen am ACE verbessert werden könnten. Dies müssten weiterführende Studien klären.

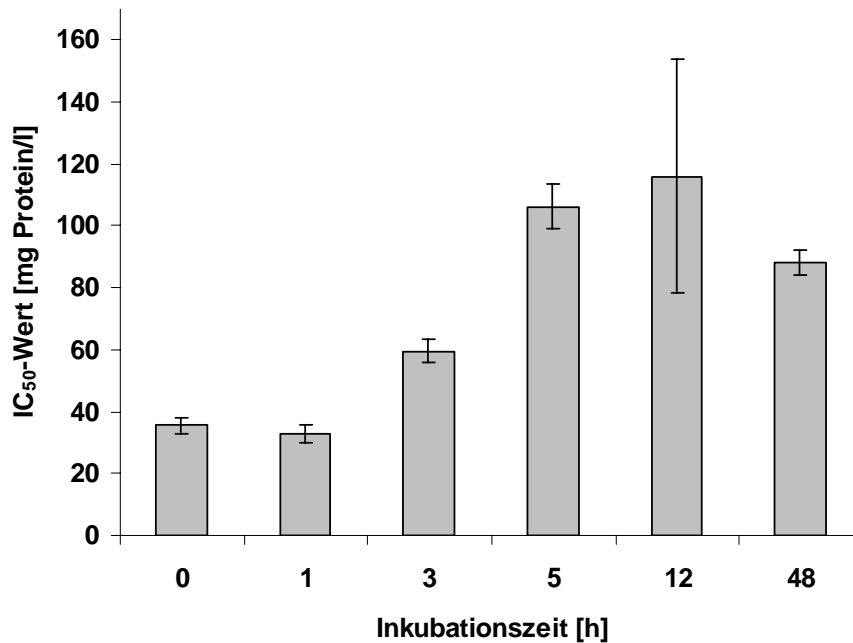


Abbildung 4.6.1-4: Darstellung der IC₅₀-Werte für ausgewählte Inkubationszeiten bei 80°C der Probe 3

4.6.2 Inkubationen mit Lactose und ausgewählten Peptiden

Anhand von Inkubationen unterschiedlicher Peptide mit Lactose sollte analog wie für die oben diskutierten HA-Nahrungen das Ausmaß der Maillard-Reaktion und damit eventuell verbundene Auswirkungen für das ACE-Hemmpotential untersucht werden. Da durchschnittlich 11 g Eiweiß und 56 g Kohlenhydrate in Säuglingsnahrungen enthalten sind, wurde das Massenverhältnis Peptid/Lactose = 1/5 gewählt, um ähnliche Reaktionsbedingungen wie im Ausgangsprodukt zu schaffen. In den Studien wurden wässrige Lösungen einer Konzentration von 12,5 g Peptid und 62,5 g Lactose pro Liter nach einer Gefriertrocknung für null, fünf und acht Stunden erhitzt. Tabelle 4.6.2-1 zeigt die verwendeten Peptide, sowie erste optische Eindrücke der trocken erhitzten Proben.

Tabelle 4.6.2-1: Farbliche Veränderung der trocken erhitzten Inkubationsansätze der unterschiedlichen Peptide, sowie zweier Peptidmischungen nach 0, 5 und 8 Stunden bei 80°C

	0 h	5h	8h
FV	farblos	farblos	gelb
GY	farblos	farblos	farblos
IW	farblos	farblos	farblos
LG	farblos	braun	tiefbraun
LGG	farblos	gelb	braun
LW	farblos	farblos	farblos
VY	farblos	blassgelb	gelb
WL	farblos	farblos	blassgelb
YV	farblos	farblos	farblos

An Hand der verschiedenen Farbentwicklung während der Inkubation werden Unterschiede in der Reaktivität der Peptide mit Lactose deutlich. Das Ausmaß der Maillard-Reaktion ist offensichtlich peptidabhängig. Als erstes Ergebnis kann also schon hier angegeben werden, dass die Glykierung peptidabhängig ist. *Roščić und Horvat (2006)* zeigten in ihren Studien dass Moleküle, wie LG und LGG, für Lactose leichter zugänglich sind und rasch weiter zu stark gefärbten Folgeprodukten reagierten. Wohl auf Grund der sterischen Hinderung reagieren die voluminösen Peptide dagegen langsamer bzw. bilden stabile Intermediate. Studien stützen die allgemeine Hypothese, dass Länge, Aminosäuresequenz und mögliche C-terminale Substituenten die *Amadori*-Produkt-Bildung von Peptiden beeinflussen.

Für alle Ansätze wurde der Einfluss auf die ACE-Aktivität untersucht. Dafür wurden je nachdem wie stark die Inhibierung der Ausgangs-peptide war, definierte Lösungen für den ACE-Aktivitätstest herangezogen (vgl. Kapitel 3.12.2). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.6.2-1 dargestellt.

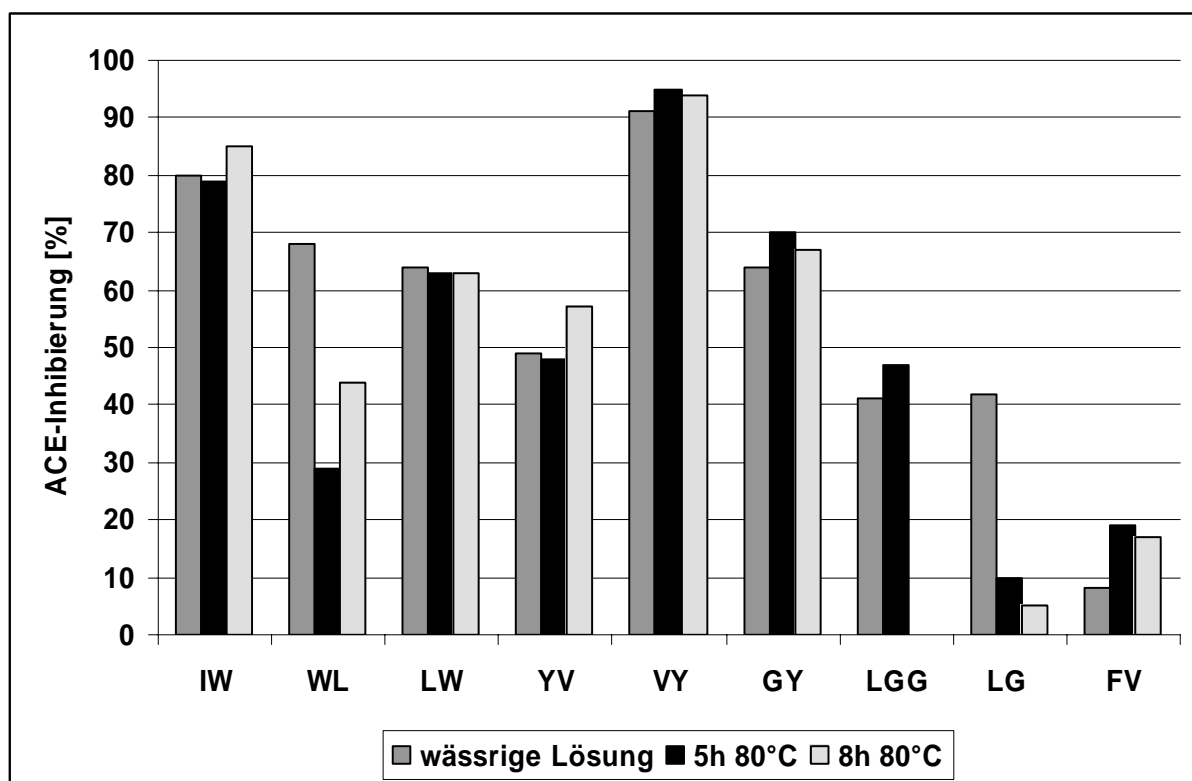


Abbildung 4.6.2.1-1: Darstellung der ACE-Inhibierung der Einzelpeptide in Abhängigkeit der jeweiligen Inkubationsdauer bei 80°C

Es zeigte sich, dass die in den HA-Nahrungen quantifizierten Peptide (IW, VY und GY) nach Umsetzung mit Lactose nur unerheblich geänderte ACE-Hemmpotentiale aufweisen. Das in den HA-Produkten vorliegende WL zeigte zwar eine schwächere inhibierende Wirkung, die allerdings nicht so stark ausfiel wie für die Inkubationsansätze von Lactose mit LG bzw.

LGG. Der geringe Einfluss des Glykierungsgrads auf die ACE-Hemmung, der für die HA-Nahrung gezeigt werden konnte, scheint durch die geringe Glykierung der wichtigsten Peptidinhibitoren (IW, WL, GY und VY) begründet zu sein. Der Ansatz FV mit Lactose zeigte zu Beginn trotz sehr hoher Peptidkonzentration kaum einen hemmenden Effekt. Dieser stieg allerdings mit der Inkubation an. Hier scheint das Peptid durch die Glykierung besser bzw. stärker an das Enzym zu binden und dadurch eine wesentlich potentere ACE-Hemmung hervorzurufen.

4.7 Untersuchungen zur simulierten gastrointestinalen Verdauung

Für die Diskussion über mögliche physiologische Konsequenzen durch die Aufnahme der identifizierten Peptid-Inhibitoren über hypoallergene Säuglingsnahrungen ist es nötig Informationen darüber zu enthalten, inwieweit sich der gastrointestinale Verdau auf die Inhaltsstoffe auswirkt. Es gilt die Frage zu beantworten, ob eine Resorption der intakten Proteine überhaupt möglich ist, oder ob sie durch proteolytische Enzyme im Magen-Darm-Trakt hydrolysiert werden und somit den ACE-hemmenden Effekt verlieren. Andererseits ist es allerdings auch nicht völlig auszuschließen, dass durch die proteolytisch wirkenden Verdauungsenzyme Peptide freigesetzt werden, die eine ACE-inhibierende Wirkung zeigen. Um diese Möglichkeiten zu untersuchen, wurde eine hypoallergene Säuglingsnahrung (Probe HA 3) sowie ein entsprechendes konventionelles Produkt (KN 3, Probe 16) ausgewählt und einer simulierten gastrointestinalen Verdauung nach einer Methode von *Hernandez-Ledesma et al. (2004)* unterzogen. Die Proben wurden im Vorfeld entrahmt, wodurch der Einfluss der Lipase vernachlässigt werden konnte. Allerdings muss angemerkt werden, dass diese Methode sich nur auf die Proteolyse konzentriert und weitere Verdauungsvorgänge z.B. Wirkungen der Amylasen, nicht berücksichtigt werden. Die Parameter für den simulierten Verdau wurden annähernd physiologischen Bedingungen angeglichen. Die Verweilzeit im Magen beträgt beim Erwachsenen für leicht verdauliche Lebensmittel durchschnittlich zwei bis drei Stunden. Die Verweilzeit der Nahrung im Magen eines Säuglings wird allerdings nur mit durchschnittlich 90 Minuten angegeben, so dass diese Inkubationszeit auch in den vorliegenden Studien gewählt wurde. Als proteolytisch wirkendes Enzym wurde Pepsin verwendet und ein pH-Wert von 3,5 eingestellt, der dem des durchschnittlichen pH-Wertes des Säuglingmagens entspricht. Die physiologischen Vorgänge im Dünndarm wurden durch Zugabe von CorolasePP, einem Enzymgemisch aus Trypsin, Chymotrypsin, Amino- und Carboxypeptidasen, bei einem pH-Wert von 7,5 nachempfunden. Die Wirkung der

CorolasePP wurde durch Probennahme zu verschiedenen Zeiten verfolgt, wobei sich auch hier an den Studien von *Hernandez-Ledesma et al. (2004)* orientiert wurde.

4.7.1 Einfluss der ausgewählten Säuglingsnahrungen HA3 und KN3 auf die ACE-Aktivität nach simulierter gastrointestinaler Verdauung

Tabelle 4.7.1-1 zeigt die durch die für die unterschiedlichen Verdaustufen ermittelten ACE-Inhibierungen der beiden Säuglingsnahrungen.

Tabelle 4.7.1-1: ACE-Inhibierung der HA-Säuglingsnahrung (HA3) sowie dem konventionellen Produkt (KN3) nach den unterschiedlichen Stufen der simulierten gastrointestinalen Verdauung (n. n. = keine Hemmung nachweisbar)

Verdaustufe	ACE-Inhibierung [%]	
	HA3	KN3
Unverdaute Probe	60,6	n. n.
Probe + P (90 min)	46,0	n. n.
Probe + P+C 30 min	50,7	n. n.
Probe + P+C 120 min	55,6	n. n.
Probe+ P+C 240 min	40,2	n. n.

Für die Bestimmung der ACE-Hemmung wurde eine Proteinkonzentration von 32 mg/l eingesetzt, da in diesem Bereich in Vorversuchen in etwa eine 50%ige Reduzierung der ACE-Aktivität durch die unverdaute HA3 erreicht wurde. Mit dieser Konzentration konnte für das konventionelle Produkt KN3 auch in den Zwischenstufen der simulierten Verdauung kein hemmender Effekt erreicht werden. Des Weiteren zeigen die Untersuchungen an der verschieden lang verdauten Probe HA3, dass es zu keiner signifikanten Veränderung im Inhibierungspotential während der simulierten gastrointestinalen Verdauung kommt.

Die ermittelten IC₅₀-Werte beider Proben vor und nach Einwirkung der Proteolyseenzyme sind in Tabelle 4.7.1-2 dargestellt.

Tabelle 4.7.1-2: Gegenüberstellung der IC₅₀-Werte der HA-Säuglingsnahrung HA3 sowie dem konventionellen Produkt KN3 vor und nach der simulierten gastrointestinalen Verdauung

	HA3	KN3
	IC ₅₀ [mg Protein/l i.A.]	
Vor simulierter Verdauung	30 ± 6	Keine Inhibierung
Nach simulierter Verdauung	29 ± 5	1331 ± 223

Für die Probe HA3 zeigte sich das gleiche Bild wie bei der Bestimmung der ACE-Inhibierung mit nur einer definierten Konzentration. Die Hemmwirkung änderte sich nicht, das heißt, dass die Vorgänge im Gastrointestinal-Trakt offensichtlich keinen Einfluss auf das ACE-hemmende Potential haben und damit physiologische Konsequenzen dieses Produktes

durchaus möglich sind. Diese Wirkung könnte nun darauf beruhen, dass entweder die für die ACE-Inhibierung verantwortlichen Peptide hydrolysestabil gegenüber den Verdauungsenzymen sind, oder dass es zum teilweisen Abbau dieser, aber auch Bildung neuer Hemmpeptide kommt. KN3 dagegen zeigte zunächst keinen Hemmeffekt, nach der proteolytischen Hydrolyse konnte allerdings ein IC_{50} -Wert von ca. 1,3 g Protein/l ermittelt werden. Es werden demnach durch die Verdauungsenzyme ACE-inhibierende Peptide freigesetzt. Allerdings liegen diese nur in geringen Konzentrationen vor, oder es geht von ihnen nur eine mäßige Hemmung aus. Im Vergleich mit den hypoallergenen Säuglingsnahrungen ist, selbst für die am schlechtesten inhibierende, eine ca. dreimal so hohe Konzentration nötig um gleiche Effekte auszulösen. Ähnliche Ergebnisse ergaben auch die Untersuchungen von *Hernandez-Ledesma et al. (2004)*. Sie simulierten die Vorgänge im Gastrointestinal-Trakt für auf dem spanischen Markt erhältliche HA- wie auch konventionelle Säuglingsnahrungen und zeigten in ihren Studien ebenfalls eine Hemmung des ACE durch Säuglingsnahrungen, in denen das Protein intakt vorliegt, nachdem diese dem oben beschriebenen gastrointestinalen Verdau durchzogen haben. Sie bestimmten in ihren Studien für dieses Produkt nicht den IC_{50} -Wert, erreichten aber mit ca. 188 mg N/l, was auf den Proteingehalt bezogen ca. 1,2 g Protein/l entspricht (Berechnungsgrundlagen siehe Kapitel 3.9). Des Weiteren ergaben ihre Untersuchungen, dass die meisten Peptide, die in den von ihnen analysierten HA-Nahrungen vorliegen, die enzymatischen Prozesse im Gastrointestinal-Trakt unbeschadet überstehen. Es wurden aber auch neue Peptide gebildet, was ausschließlich nach Behandlung mit CorolasePP geschah (*Hernandez-Ledesma et al., 2004*). In den spanischen Produkten werden allerdings neben Molkenproteinen auch Caseine bzw. teilweise auch Sojaproteine eingesetzt. Im inländischen Markt dagegen werden für partielle hydrolysierte Produkte, wie sie die HA-Produkte darstellen, nur Molkenproteine bzw. deren Hydrolysate verwendet (*Exl, 2001*). Daher wurden im Nachfolgenden weitere Analysen durchgeführt, die die Freisetzung, den Abbau bzw. die Stabilität ACE-hemmender Peptide aufklären bzw. den Verlauf der Hydrolyse beschreiben sollten.

4.7.2 Untersuchungen des Hydrolyseverlaufes der Säuglingsnahrungen HA3 und KN3 mittels GPC

Der Verlauf der simulierten gastrointestinalen Verdauung wird an Hand der Molmassenverteilung, die mittels Gel-Permeationschromatographie ermittelt wurde, beschrieben. Diese Studien sollten zeigen, ob es während der Hydrolyse durch Verdauungsenzyme zu einem weiteren Abbau des Molkenproteinhydrolysats der HA-

Nahrung sowie des intakten Milchproteins der konventionellen Nahrung kommt. Die Chromatogramme der Substanzen wurden hier in vier Molmassenbereiche eingeteilt (Tabelle 4.7.2-1).

Tabelle 4.8.2-1: Einteilung der Molmassenbereiche der Gelpermeationschromatographie

Molmassenbereich	Einteilung [Da]	Resultierende Elutionszeit [min]
Hochmolekular	> 14 000	< 20
Mittel 1	14 000 – 1000	20 – 27
Mittel 2	1000 – 175	27 – 33
Niedermolekular	< 175	> 33

Die Aufteilung wurde dabei so gewählt, dass alle intakten Proteine im hochmolekularen Bereich eluieren. Interessant ist vor allem der Bereich, in dem Verbindungen mit einer molaren Masse von 1 - 0,175 kDa eluieren. Nicht nur, da hier die meisten ACE-Peptidinhibitoren erwartet werden, auch eine mögliche passive Diffusion durch biologische Membranen ist von der Größe der Verbindungen abhängig. Als Limit werden hierbei meist Substanzen mit einer maximalen Masse von 1 kDa angegeben (*Eisenbrand et al., 2005*).

Der Verlauf der Hydrolyse für die HA-Nahrung HA3 ist mittels der GPC-Chromatogramme der unterschiedlichen Verdaustufen in Abbildung 4.7.2-1 dargestellt.

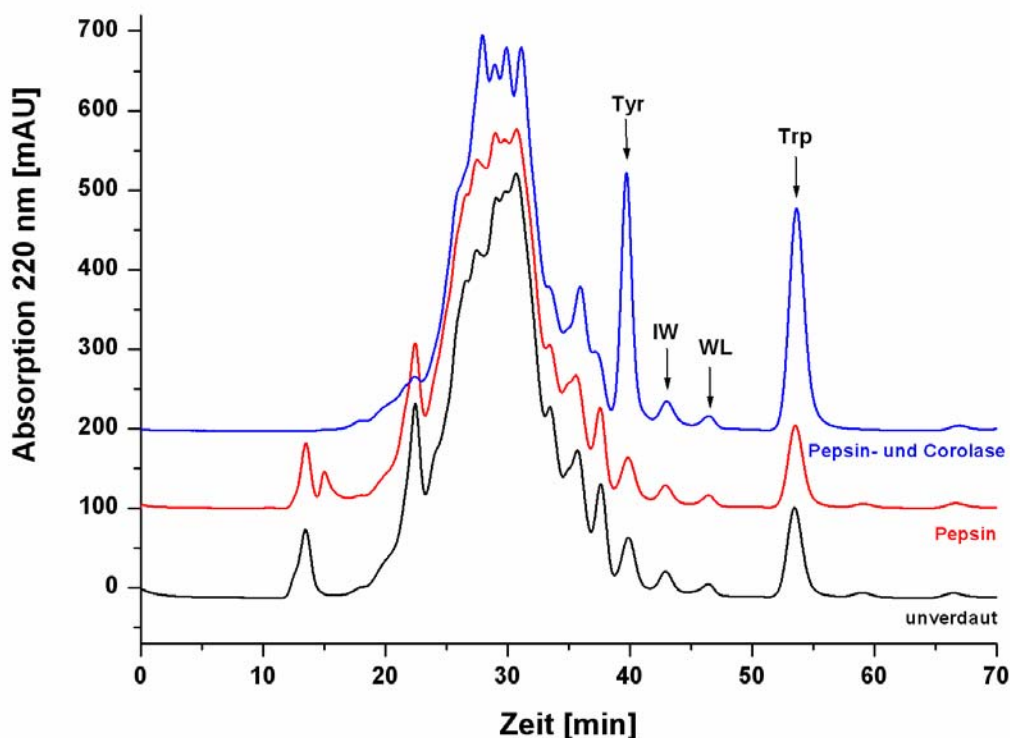


Abbildung 4.7.2-1: GPC-Chromatogramm der Probe HA3 nach den unterschiedlichen Stufen der simulierten gastrointestinalen Verdauung

Für einige Verbindungen war auf Grund des Vergleichs der Elutionszeiten mit Standardsubstanzen eine Zuordnung möglich. Größere Veränderungen im Chromatogramm sind erst nach dem simulierten Dünndarmverdau zu erkennen. Allerdings sind auch die nicht sehr stark. Das restliche intakte Protein und teilweise langkettige Peptide die zwischen 14 - 1 kDa liegen, wurde erst nach der vollständigen Simulation der gastrointestinalen Vorgänge abgebaut. Intaktes Protein ist hier nicht mehr nachweisbar. Der Molmassenbereich zwischen 1 und 0,175 kDa zeigt kaum Veränderungen, nur im niedermolekularen Bereich konnte ein deutlicher Anstieg der Aminosäure Tyrosin ($E_t = 39,5$ min), sowie Tryptophan ($E_t = 54$ min) ausgemacht werden. Der potente ACE-Inhibitor IW ($E_t = 43$ min) allerdings zeigt während der kompletten Untersuchung keine Veränderung. Das bedeutet, dass dieser weder abgebaut noch durch die eingesetzten Enzyme freigesetzt wird. Exakte Aussagen lassen sich treffen, wenn die prozentualen Flächenanteile der jeweiligen Molmassenbereiche verglichen werden. Tabelle 4.8.2-2 zeigt diese nach jeder Verdaustufe. Auch hier wird nochmals deutlich, dass nur in den beiden ersten Bereichen bis 1 kDa ein geringer Abbau von Verbindungen stattfand.

Tabelle 4.7.2-2: Prozentuale Flächenanteil der Molmassenbereich der Probe HA3 nach den unterschiedlichen Stufen der simulierten gastrointestinalen Verdauung

	prozentuale Flächenanteile der Molmassenbereiche [%]			
	> 14 kDa	14 - 1 kDa	1 - 0,175 kDa	< 0,175 kDa
unverdaute Probe	3,3	26,3	47,8	22,6
Probe + P (90 min)	4,1	27,1	47,5	21,3
Probe + P+C 30 min	1,2	22,4	48,2	28,2
Probe + P+C 120 min	1,1	20,4	48,1	30,4
Probe + P+C 240 min	1,0	19,3	48,1	31,6

Im Molmassenbereich zwischen 1 und 0,75 kDa wurden dagegen nahezu konstante Flächenanteile ermittelt und wie auch schon oben diskutiert, ist die leichte Zunahme im niedermolekularen Bereich zum Großteil den beiden Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin zuzuschreiben. Dies zeigt, dass die für die gesamte ACE-inhibierende Wirkung verantwortlichen Peptide, im Besonderen das IW, während den Verdauungsvorgängen nicht abgebaut wurden und den oben bestimmten konstanten IC_{50} -Wert begründen.

Vollkommen anderes verhielt sich dagegen die konventionelle Säuglingsnahrung KN3. Die ermittelten Molmassen-Profile der unterschiedlichen Verdaustufen sind in Abbildung 4.7.2-2 dargestellt. Die unverdaute Probe zeigte fast ausschließlich Verbindungen im hochmolekularen Bereich > 14 kDa. Wenige Substanzen eluierten später, da auch in dieser Probe freie Aminosäuren, wenige Peptide und andere UV-aktive Verbindungen, wie beispielsweise Vitamine enthalten sind. Schon nach der simulierten Magenpassage mit Pepsin

zeigte sich ein deutlicher Abbau der Proteine und eine Verschiebung der Hydrolysefragmente weiter in den hinteren Molmassenbereich ($< 1\text{kDa}$).

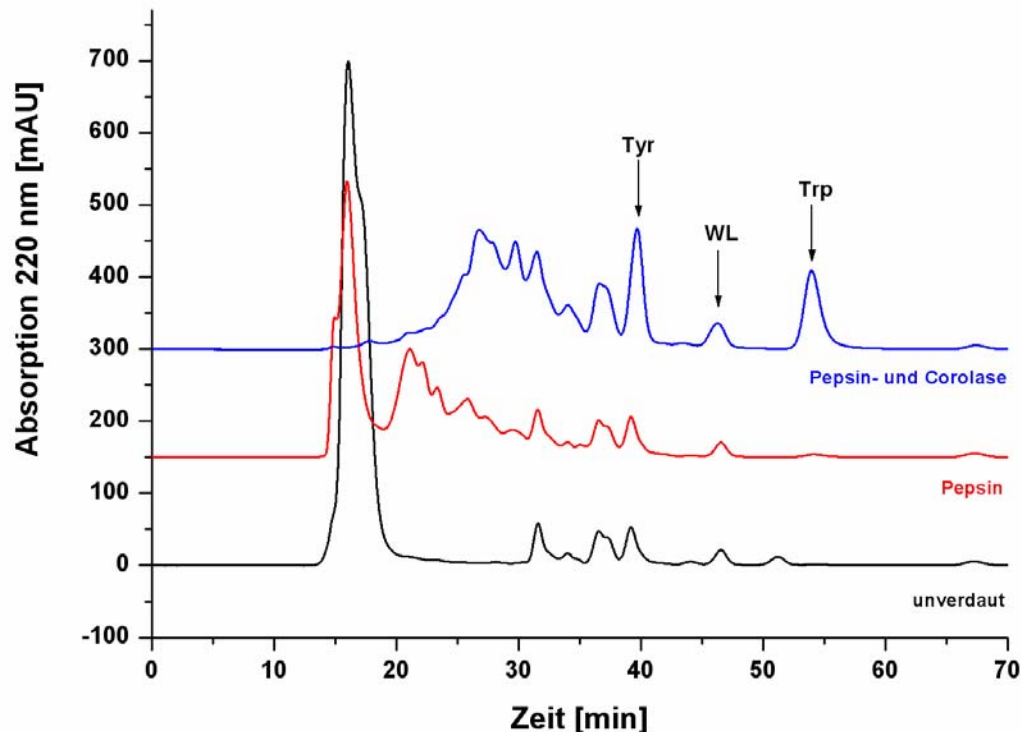


Abbildung 4.7.2-2: GPC-Chromatogramm der konventionellen Nahrung KN3 nach den unterschiedlichen Stufen der simulierten gastrointestinalen Verdauung

Mittels Standardsubstanzen konnten auch hier einige Peptide bzw. Aminosäuren zugeordnet werden. Interessanterweise wurde während des simulierten gastrointestinalen Verdaus das Peptid IW nicht in mit der verwendeten Methode nachweisbaren Mengen freigesetzt. Dagegen konnte schon nach der Pepsineinwirkung das Dipeptid WL ($E_t = 46,4\text{ min}$) bestimmt werden. Auch WL wurde in der vorliegenden Arbeit als ACE-inhibierendes Peptid ermittelt (IC_{50} -Wert = $10\text{ }\mu\text{M}$). Dieses Proteinfragment kommt zweimal in der Aminosäuresequenz des α -Lactalbumins vor und liegt mit den Positionen α -La 104-105 und α -La 116-117 im hinteren Bereich des C-Terminus des Proteins vor. Daher ist für die Position α -La 116-117 anzunehmen, dass diese sehr schnell durch die Proteolyseenzyme freigesetzt wird. In der Literatur wurde bisher nur eine Freisetzung durch enzymatische Hydrolyse aus Glycinin, einem Sojaprotein, beschrieben (Kuba *et al.*, 2005). Es kann davon ausgegangen werden, dass diesem Dipeptid ein Großteil der neu entstehenden Hemmwirkung zugeschrieben werden kann. Auch für das konventionelle Produkt KN3 wurden die prozentualen Flächenanteile bezogen auf die Gesamtfläche der unterschiedlichen Verdaustufen für eine bessere Veranschaulichung ermittelt und in Tabelle 4.7.2-4 dargestellt.

Tabelle 4.7.2-4: Prozentuale Flächenanteil der Molmassenbereich der Probe KN3 nach den unterschiedlichen Stufen der simulierten gastrointestinalen Verdauung

	prozentuale Flächenanteile der Molmassenbereiche [%]			
	> 14 kDa	14 - 1 kDa	1 - 0,175 kDa	< 0,175 kDa
unverdaute Probe	81,3	2,6	4,0	12,1
Probe + P (90 min)	41,0	33,7	12,1	13,2
Probe + P+C 30 min	3,3	36,6	28,0	32,1
Probe + P+C 120 min	2,1	26,5	33,6	37,8
Probe + P+C 240 min	1,9	22,2	35,6	40,3

Allein der simulierte Verdauungsvorgang des Magens trug zu einem 50%igen Abbau bei. Schon nach kurzer Zeit im „Dünndarm“ schien fast alles hydrolysiert. Auch hier wird nochmals sichtbar, dass sich der prozentuale Flächenanteil mit jeder Stufe der Verdauung immer mehr in den niedermolekularen Molmassenbereich verschob. Zwar lagen auf die Gesamtfläche aller detektierten Verbindungen bezogen am Ende der simulierten gastrointestinalen Vorgänge ähnliche prozentuale Anteile vor wie in der HA3-Probe, doch die Hemmwirkung der beiden Proben unterschied sich erheblich. So zeigt auch diese Untersuchung, dass nur anhand des Hydrolysegrades keine Angaben über das Potential einer ACE-Inhibierung getroffen werden kann.

4.7.3 Untersuchungen zur Stabilität ausgewählter Peptide während simulierter gastrointestinaler Verdauung

Da die tryptophanhaltigen Peptide IW und WL offensichtlich einen enormen Anteil an dem gesamten Hemmvermögen der untersuchten Säuglingsnahrungen haben, sollte nachfolgend mit den Einzelpeptiden die gastrointestinale Verdauung simuliert werden, um die Stabilität der Peptide gegenüber den Proteolyseenzymen zu beweisen und damit auf mögliche physiologische Konsequenzen hinzuweisen. Da statt IW in der Humanmilch an gleicher Stelle LW im α -Lactalbumin vorliegt, wurde auch dieses Peptid untersucht. Der Verlauf der simulierten Verdauung wurde auch hier mittels GPC verfolgt und ist für die drei Peptide im folgenden dargestellt. Die Analysenergebnisse zeigten im Falle des IW, dass keine Hydrolyse durch die Verdauungsenzyme stattgefunden hatte. Zwar verringerte sich der Flächenanteil des Dipeptids minimal, aber dies kann durch die Zugabe der Proteolyseenzyme erklärt werden. Dabei kam es zu einer geringen Verdünnung, die im Chromatogramm sichtbar wurde. Würde es zu einem Abbau des Peptides zu den Aminosäuren Isoleucin und Tryptophan kommen, müsste letztere im Chromatogramm zu sehen sein und kurz hinter IW eluieren.

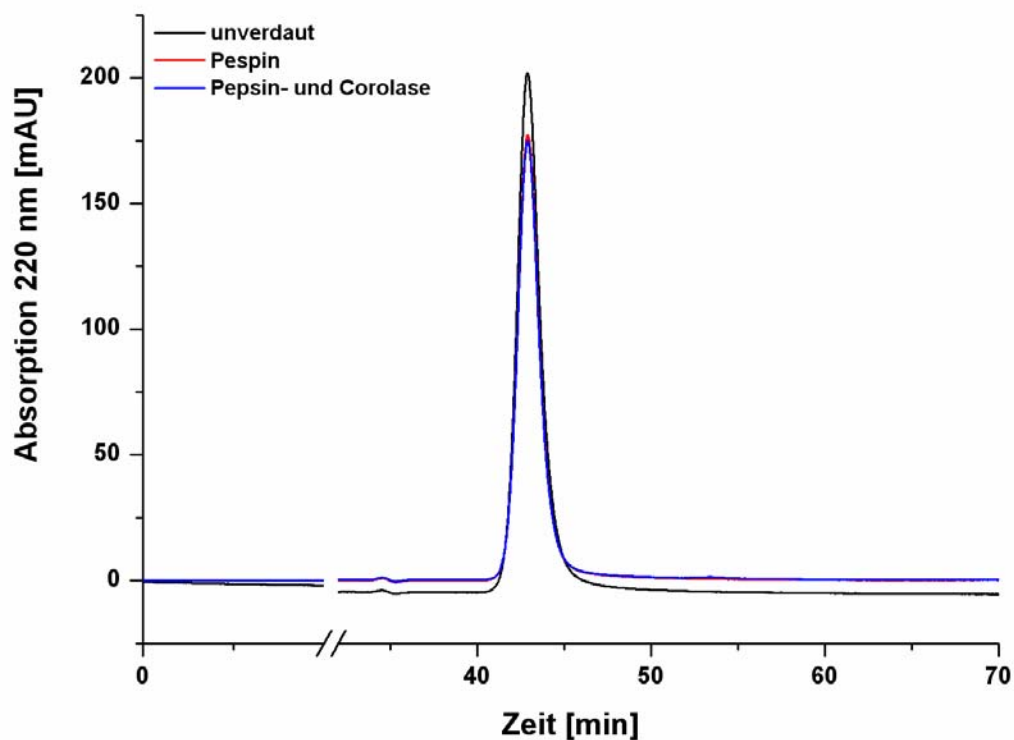


Abbildung 4.7.4-2: GPC-Chromatogramme von IW nach den unterschiedlichen Stufen der simulierten gastrointestinalen Verdauung

Aber hier konnte keine Verbindungen detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich die Bildung von Tryptophan nach dem simulierten Verdau der beiden Peptide WL bzw. LW. Zwar war dieser noch immer sehr gering, aber dennoch eindeutig nachweisbar. Bezogen auf den Ausgangsgehalt wurden nach der simulierten Verdauung nur noch 76% LW bzw. 78% WL bestimmt. LW unterlag demnach dem Abbau durch die Enzyme minimal stärker als WL. Der Unterschied entsprach zwar nur 2%, dennoch unterstreicht dies wie wichtig die Position der Aminosäuren im Peptid ist. Die hohe Proteolysestabilität der Peptide gegenüber den eingesetzten Enzymen war so im Vorfeld nicht zu erwarten. Denn die Theorie besagt, dass Pepsin beispielsweise die Peptidbindung vorrangig nach hydrophoben, aromatischen Aminosäuren, aber auch nach Leucin spaltet. Gleiches gilt für Chymotrypsin, das in dem Enzymgemisch der CorolasePP enthalten ist. Daher sollten die Peptide eigentlich einem Abbau unterliegen. Allerdings handelt es sich um Dipeptide, so dass diese wahrscheinlich weitere wichtige Bindungen im aktiven Zentrum des Enzyms nicht eingehen können und damit auch keine Freisetzung zu den Aminosäuren erfolgen kann.

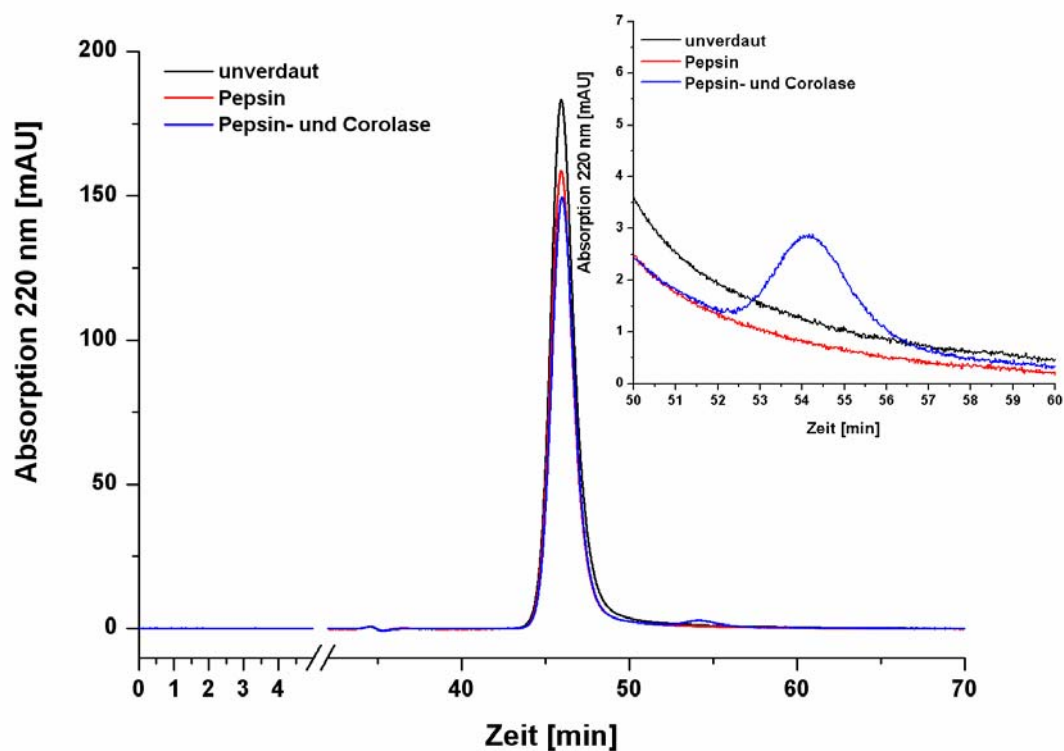


Abbildung 4.7.4-3: GPC-Chromatogramme von WL nach den unterschiedlichen Stufen der simulierten gastrointestinalen Verdauung

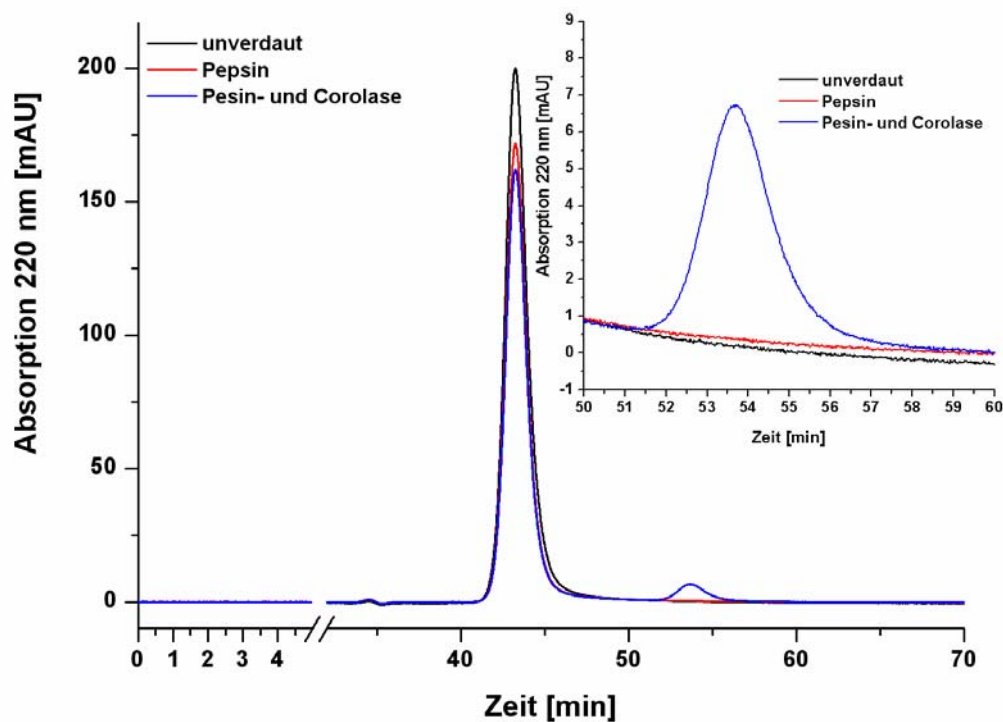


Abbildung 4.7.4-3: GPC-Chromatogramme von LW nach den unterschiedlichen Stufen der simulierten gastrointestinalen Verdauung

Zusammengefasst zeigen die Studien der simulierten gastrointestinalen Verdauung, dass durch die im Gastrointestinal-Trakt ablaufenden Vorgänge ACE-hemmende Verbindungen aus intaktem Protein freigesetzt werden können, allerdings nicht in dem Ausmaß, dass eine potente ACE-Inhibierung erzeugt wird. Der hemmende Effekt hypoallergener Säuglingsnahrungen wird nicht erreicht. Diese veränderte ihr hemmendes Potential nicht während der Proteolyse. Die am stärksten hemmenden Peptide IW und WL zeigten sich stabil gegen die proteolytische Aktivität der Verdauungsenzyme. Der sehr potente Inhibitor IW ($IC_{50} = 0,7 \mu M$) wurde nicht abgebaut und WL ($IC_{50} = 10 \mu M$) nur zu 12%. Das bedeutet, dass eine der wichtigsten Voraussetzungen für eine mögliche ACE-Hemmung *in vivo*, die Stabilität gegenüber den Verdauungs-Proteasen, erfüllt ist. Allerdings gelangen die Peptide nach Resorption in die Enterocyten, wo der erste Umbau der Peptide stattfindet, so dass die Aminosäure-Zusammensetzung im Pfortaderblut schon anders ist als noch im Darm. Inwieweit demnach eine hypotensive Wirkung, ausgelöst nach Aufnahme der Peptide bzw. der hypoallergenen Säuglingsnahrung möglich ist, sollten nachfolgende Untersuchungen klären.

4.8 Einfluss ausgewählter Peptide sowie hypoallergener Säuglingsnahrungen auf die ACE-Aktivität in kultivierten humanen Endothelzellen (HUVECs)

Die in den vorherigen Kapiteln diskutierten Ergebnisse zeigen, dass in den hypoallergenen Säuglingsnahrungen ACE-hemmende Peptide vorliegen, die auch eine Inhibierung des Enzyms *in vivo* zeigen könnten. Voraussetzung dafür ist allerdings auch, dass die hemmenden Verbindungen im Zellsystem stabil sind und dort nicht von Proteasen abgebaut werden. Daher war es das Ziel, die Ergebnisse des *in vitro* Verfahrens auch auf ein *ex vivo* System zu übertragen, um mögliche physiologische Konsequenzen diskutieren zu können und die Relevanz eines *in vivo* Testverfahrens zu unterstreichen. Zur Bestimmung des ACE-inhibierenden Potentials *ex vivo* wurde ein Testsystem mit humanen Endothelzellen aus Nabelschnüren, so genannten HUVECs, etabliert. Dieses Zellsystem wurde gewählt, da es sich dabei um gesunde humane Zellen im Gegensatz zu den für andere Studien häufig genutzten Krebszelllinien handelt und damit eine möglichst gute Annäherung an physiologische Vorgänge erreicht wird. Das ACE ist an der luminalen Oberfläche der Endothelzellen gebunden, so dass die katalytische Funktion extrazellulär vorliegt. Für die Studien wurden die Parameter des *in vitro* Verfahrens auf den Test mit dem Zellsystem übertragen. Als Substrat für das ACE sollte deshalb ebenfalls das N-Benzoyl-glycyl-L-

histidyl-L-leucin (HHL) dienen, welches durch das Enzym zu Hippursäure umgesetzt wird, die mit derselben RP-HPLC-Methode quantifiziert wird und womit, wie schon beschrieben, der Einfluss verschiedener Verbindungen auf das ACE ermittelt werden kann. Das Substrat wie auch das Produkt eignen sich sehr gut für das Testsystem, da sie ursprünglich weder in den Zellen noch in verwendeten Zellpuffern vorkommen. Neben enzymkinetischen Parametern wurden schließlich ausgewählte Peptide analysiert. Dabei wurde vorwiegend auf Peptide zurückgegriffen, die u. a. in den HA-Nahrungen identifiziert werden konnten, sowie eine hypoallergene Säuglingsnahrung (HA3) selbst. Die aus diesen Untersuchungen resultierenden Ergebnisse wurden denen des *in vitro* Verfahrens gegenübergestellt.

4.8.1 Enzymkinetische Parameter der ACE-Aktivität in HUVECs

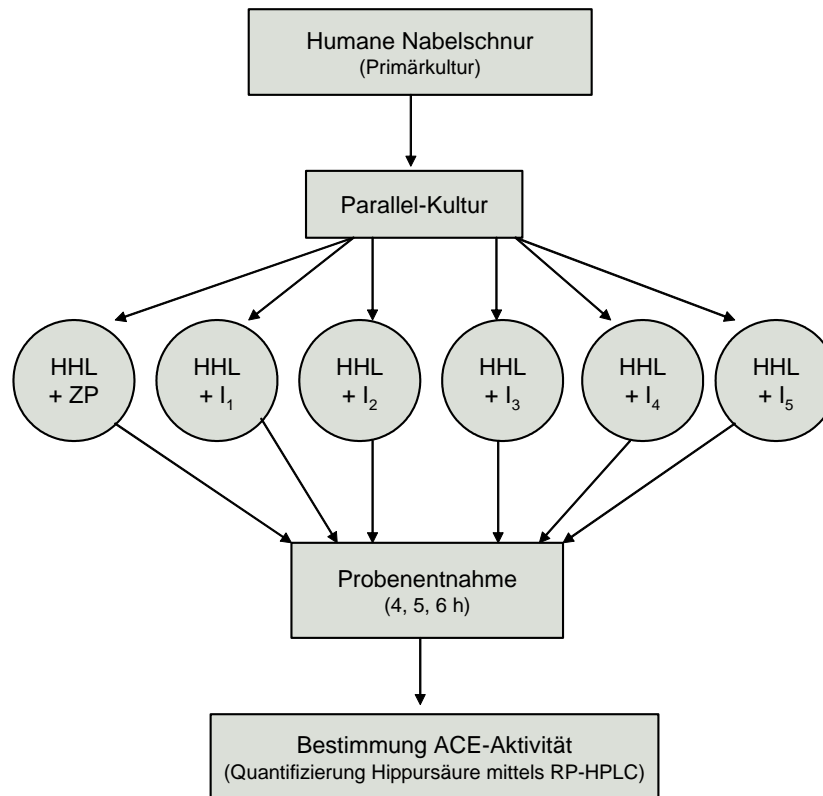
Bevor der Einfluss der unterschiedlichen Substanzen auf die ACE-Aktivität *ex vivo* bestimmt werden konnte, mussten zunächst einige Voruntersuchungen durchgeführt werden. Grundvoraussetzung aller Messungen war, dass ausschließlich mit konfluenten humanen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVECs) gearbeitet wurde. Die Aufarbeitung dieser erfolgte nach einer von *Pexa (2006)* etablierten Methode, welche im Material und Methoden Abschnitt ausführlich beschrieben wurde. Um zu gewährleisten, dass die Zellen nicht durch die verwendeten Chemikalien geschädigt werden und es dadurch zu falschen Interpretationen der Ergebnisse kommen würde, wurden unter anderem Vitalitätstests mittels Trypan-Blau-Färbung durchgeführt. Es wurde untersucht, inwieweit sich die Inkubation auf die Vitalität der Zellen auswirkt, da diese mehrere Stunden bei 37°C andauerte und während der Zeit leicht geschüttelt wurde, damit eine stets homogene Vermischung des Substrates sowie der Testsubstanzen gewährleistet wurde. In den nächsten Schritten wurde der normalen Pufferlösung das Substrat N-Benzoyl-glycyl-L-histidyl-L-leucin (HHL), was auch im *in vitro*-Testverfahren als Substrat verwendet wurde, sowie das Produkt Hippursäure und einige ausgewählte Peptide ohne Zusatz von HHL zugesetzt. Es zeigte sich, dass es zwar zu einer geringen Vitalitätsabnahme der Zellen kommt, allerdings passiert dies auch schon ohne jeglichen Chemikalienzusatz, allein auf Grund der Inkubation. Daher kann davon ausgegangen werden, dass keine der verwendeten Substanzen eine toxische Wirkung auf die Zellen zeigt. Wichtig für die Enzymkinetik ist, dass die Aktivitätsbestimmungen im linearen Bereich der Enzymreaktion gemessen werden. Daher wurde für die Ermittlung der optimalen Inkubationszeit für die ACE-Aktivitätsmessungen an HUVECs eine Untersuchung zum Umsatz von HHL über 24 Stunden durchgeführt, wobei stündlich der Umsatz zu Hippursäure bestimmt wurde. Diese Untersuchungen ergaben einen kontinuierlichen Abbau des Substrates,

wobei sich ein linearer Bereich zwischen drei und acht Stunden einstellte. Die Inkubationen zur Bestimmung der ACE-Aktivität wurden deshalb über vier, fünf und sechs Stunden durchgeführt. Für einen Enzym-Aktivitäts-Test ist die gewählte Substratkonzentration ein sehr wichtiger Parameter. Diese sollte über der Michaelis-Menten-Konstante K_m liegen. Dieser Wert beschreibt die Substratkonzentration, bei der die Enzymreaktion mit halbmaximaler Geschwindigkeit abläuft. Im optimalen Fall sollte die Substratkonzentration zur Aktivitätsbestimmung zehnmal so hoch gewählt werden. Allerdings sind solch hohe Konzentrationen in der Praxis häufig nicht möglich, da es hier oft zur Inhibierung des Enzyms durch das Substrat kommt, bzw. das Substrat in dem Systempuffer nicht mehr löslich ist. Um für den ACE-Aktivitätstest in den HUVECs die optimale Substratkonzentration einzusetzen, musste demnach zuerst der K_m -Wert ermittelt werden. Diese Bestimmung läuft wie in Kapitel 2.2 und 3.6. beschrieben ab. Der in diesen Analysen ermittelte Wert sowie der für das *in-vitro* Testverfahren bestimmte sind in Tabelle 4.8.1-1 gegenübergestellt. Die Michaelis-Menten-Konstanten der beiden Systeme sind deutlich unterschiedlich. Die Affinität des ACE aus den humanen Endothelzellen zu dem Substrat ist höher als es für das aus dem *in vitro*-Testsystem.

Tabelle 4.8.1-1: K_M – Werte der verschiedenen Testsysteme

Testsystem	K_m - Wert [mM]
<i>in vitro</i>	$1,88 \pm 0,37$
<i>ex vivo</i>	$0,67 \pm 0,14$

In diesem Testverfahren wurde das isolierte ACE aus der Kaninchenlunge verwendet, was die starken Unterschiede erklärt. Für die *in vitro* ACE-Aktivitätsbestimmung wurde eine HHL-Konzentration von 5 mM eingesetzt. Höhere Konzentrationen waren nicht möglich, denn wie oben erwähnt, kam es auch hier bei höheren Substratgehalten (ab 6-7 mM) zur Enzymhemmung. Dieses Phänomen trat bei dem humanen ACE schon bei deutlich geringeren Konzentrationen von 2 – 2,5 mM auf. Daher wurde bei dem Testsystem an HUVECs eine Substratkonzentration von 1,5 mM eingesetzt, was analog zu dem *in vitro* Aktivitäts-Assay ca. 2,5mal dem K_M -Wert entspricht. Das unten dargestellte Schema zeigt kurz den Ablauf der *ex vivo* ACE-Aktivitätsbestimmung mittels HUVECs.



HHL N-benzoyl-glycyl-L-histidyl-L-leucin
 ZP Zellpuffer
 I₁-I₅ Inhibitorkonzentration unterschiedlicher Verdünnungen im Zellpuffer

Abbildung 4.8.1-1: Schematische Darstellung der ACE-Aktivitätsbestimmung an humanen Endothelzellen (HUVECs)

Nach entsprechender Präparation wurde die Kultur auf sechs Zellkulturplatten aufgeteilt. Die sechs Zellplatten mit je einer Parallel-Kultur dienten jeweils einer ACE-Aktivitätsbestimmung mit entsprechender Substanzzugabe in unterschiedlichen Konzentrationen (I₁ - I₅). Eine Platte diente immer als Blindwert, zu der statt Inhibitorlösung das entsprechende Volumen Zellpuffer gegeben wurde, in dem alle Substanzen gelöst wurden. Dieser Blindwert entspricht einem 100%igen Umsatz von HHL zu Hippursäure und damit einer 100%igen ACE-Aktivität. Nach Inkubation bei 37°C unter ständigem, vorsichtigem Schütteln, wurden die Proben entnommen und der Gehalt an Hippursäure mittels RP-HPLC quantifiziert. Zur Berechnung des IC₅₀-Wertes diente wie schon in den *in vitro*-Analysen das Softwareprogramm SigmaPlot 5.0 (vgl. Kapitel 4.1).

Wie schon oben erwähnt, wurden in jeder Testreihe drei unterschiedliche Inkubationszeiten gewählt, die sich alle im linearen Bereich der Enzymreaktion befanden. Dies geschah, da die ACE-Aktivität der verschiedenen Primärkulturen nicht immer identisch war und damit sichergestellt wurde, dass eine ausreichende Menge an Hippursäure zur eindeutigen

Quantifizierung, auch im Falle einer Inhibierung des ACE, zur Verfügung stand. Es zeigte sich bei allen durchgeführten Analysen, dass immer der gleiche prozentuale Effekt der Peptid-Inhibitoren bezogen auf den entsprechenden Blindwert für vier, fünf bzw. sechs Stunden Inkubation auftrat. Des Weiteren wurde untersucht, ob im Zellsystem enthaltene Proteasen die zu testenden Peptide abbauen und somit eine ACE-Inhibierung abgeschwächt wird. Dafür wurden die Peptide bis zu sechs Stunden mit den HUVECs inkubiert und anschließend die Lösungen vor und nach Inkubation mittels RP-HPLC vermessen, um eventuelle Konzentrationsänderungen festzustellen. Die meisten Peptide zeigten nur eine minimale Hydrolyse von ca. 10%. Nur zwei Dipeptide wiesen höhere Verluste von bis zu 21% auf. Das relativ große Peptid PTHIKWGD dagegen wurde sehr stark hydrolysiert. Es konnte ein Abbau von bis zu 82% ermittelt werden. Als Folge hiervon wird die Inhibitorkonzentration niedriger und damit wird der hemmende Effekt der Verbindung fälschlicherweise als zu gering bestimmt. Dies wird in die nachfolgende Diskussion über die inhibierende Wirkung der untersuchten Substanzen einbezogen. Die Tabelle 4.8.1-2 zeigt die Peptide, für die eine Konzentrationsänderung ermittelt werden konnte.

Allgemein scheinen die meisten untersuchten Dipeptide relativ stabil gegen eine mögliche Hydrolyse durch die im Zellsystem vorkommenden Proteasen zu sein. Dagegen werden größere Peptide schnell abgebaut.

Tabelle 4.8.1-2: Prozentualer Abbau der Peptide nach Inkubation an HUVECs

Testsubstanz	Abbau [%] nach		
	4 h	5 h	6 h
Pro-Thr-His-Ile-Lys-Trp-Gly-Asp (PTHIKWGD)	55	78	82
Tyr-Ala (YA)	0	4	10
Phe-Val (FV)	10	15	16
Val-His (VH)	8	17	21
Val-Trp (VW)	0	1	6
Tyr-Val (YV)	0	3	5
Val-Tyr (VY)	0	2	7
Gly-Tyr (GY)	0	0	4
Ile-Trp (IW)	0	0	2

4.8.2 Bestimmung des Effektes unterschiedlicher Substanzen auf die ACE-Aktivität in HUVECs

Nach der Etablierung des Testsystems wurden verschiedene Substanzen ausgewählt, deren Einfluss auf die ACE-Aktivität untersucht werden sollte. Getestet wurde der synthetische Arzneistoff Captopril, Peptide mit unterschiedlich starkem *in vitro* Hemmeffekt, sowie eine hypoallergene Säuglingsnahrung (Probe 3). Für alle Verbindungen wurde mindestens eine fünffach Bestimmung durchgeführt und die ACE-Aktivität an verschiedenen Primärkulturen bestimmt, um Fehler durch eine genetische Abweichung der verwendeten Zellen, die sich in der Enzymaktivität äußern könnten, bzw. den erhöhten Abbau des eingesetzten Inhibitors zu verhindern. Ziel dieser Studie war es Aussagen darüber treffen zu können, ob die Hemmwirkung an HUVECs derjenigen der *in vitro* – Studien Bestimmten entspricht. In Tabelle 4.8.2-1 sind die analysierten Substanzen und die IC₅₀-Werte der *in vitro* wie die der *ex vivo* Analysen gegenübergestellt. Wie die Daten zeigen, war die ACE-Inhibierung mit einer relativ kleinen Fehlerspanne bestimmbar. Allgemein zeigten die Studien, dass alle Substanzen auch das humane ACE in den HUVECs hemmten. Der als Arzneimittel eingesetzte ACE-Hemmer Captopril zeigt *in vitro* einen stärkeren Hemmeffekt als in den *ex vivo*-Versuchen. Es ist eine zehnmal so hohe Konzentration nötig um den gleichen Hemmeffekt zu bewirken.

Tabelle 4.8.2-1: Gegenüberstellung der *in vitro* bzw. *ex vivo* ermittelten IC₅₀ – Werte ausgewählter Verbindungen sowie einer hypoallergenen Säuglingsnahrung (HA3)

Testsubstanz	IC ₅₀ - Wert [µM]	
	<i>in vitro</i> (Extrakt)	<i>ex vivo</i> (HUVEC)
Captopril	0,0013 ± 0,0003	0,012 ± 0,008
Pro-Thr-His-Ile-Lys-Trp-Gly-Asp (PTHIKWGD)	4,2 ± 1,6	2,3 ± 1,7
Tyr-Ala (YA)	215 ± 36	631 ± 61
Phe-Val (FV)	> 1 mM	361 ± 201
Val-His (VH)	425 ± 114	504 ± 189
Val-Trp (VW)	1,2 ± 0,3	50 ± 34
Tyr-Val (YV)	> 1 mM	459 ± 82
Val-Tyr (VY)	26 ± 7	29 ± 7
Gly-Tyr (GY)	180 ± 20	191 ± 26
Ile-Trp (IW)	0,7 ± 0,3	4,5 ± 1,8
HA3	30 ± 6	63 ± 8

Allerdings liegt der IC_{50} - Wert noch immer im niederen Nanomolaren Bereich, und mit Berücksichtigung des Fehlerbereiches kann gesagt werden, dass ein ähnliches Inhibierungspotential vorliegt. Sowohl GY als auch VY, die auch in den HA-Nahrungen identifiziert und quantifiziert wurden, weisen *in vitro* und *ex vivo* vergleichbare Hemmwirkungen auf. Beide Dipeptide unterlagen nur einem vernachlässigbaren Abbau, wobei der bei VY etwas größer war als bei GY. Die weiteren analysierten Dipeptide zeigten meist eine leicht schlechtere ACE-Inhibierung für das humane ACE. Allerdings fanden sich auch Hinweise auf den gegenteiligen Effekt. Besonders interessant ist dabei das Peptid PTHIKWGD. Dieses Oktapeptid ist als ACE-Inhibitor bekannt und zeigt mit einem *in vitro* IC_{50} -Wert von $4,2 \mu M$ eine sehr gute Hemmwirkung. Die Tests an den HUVECs ergaben, dass ungefähr nur die Hälfte der Peptidkonzentration nötig war, um den gleichen Effekt zu erzielen. Dies erscheint umso erstaunlicher, da für dieses Peptid ein starker Abbau festgestellt wurde (siehe Tabelle 4.8.1-1). Es konnte allerdings kaum ein Unterschied im IC_{50} -Wert nach den unterschiedlichen Inkubationszeiten ausgemacht werden. Nur der Wert nach sechs Stunden Inkubation zeigte eine leichte Erhöhung um $0,7 \mu M$. Das bedeutet, dass die Hydrolyseprodukte, bzw. eines davon, auch eine starke ACE-Hemmung hervorrufen müssen und somit für einen nahezu gleich bleibenden Hemmeffekt sorgen. In den vorliegenden Studien wurde dieses Phänomen allerdings nicht weiter untersucht. Auch die beiden Dipeptide FV und YV zeigten im Test an HUVEC einen stärkeren hemmenden Effekt. *In vitro* wurde nicht der genaue IC_{50} -Wert ermittelt, da er über 1 mM lag und bei höheren Konzentrationen sich die Peptide nicht mehr vollständig im Puffer lösten bzw. wieder ausfielen, was eine exakte Bestimmung verhinderte. Allerdings kann ein Peptid mit einem IC_{50} -Wert über 1 mM als schlechter Hemmstoff eingestuft werden, so dass eine exakte Bestimmung nicht nötig war. Interessant dagegen ist, dass eine deutlich bessere Hemmung des humanen ACE erreicht werden konnte. Dieser Effekt war bei FV etwas höher, obwohl das Peptid einem leichten Abbau unterlag (siehe Tabelle 4.8-1-1). Von besonderem Interesse bei diesen Studien waren die Ergebnisse, die für die hypoallergene Säuglingsnahrung und für den darin enthaltenen Peptidinhibitor IW ermittelt wurden. Bei der untersuchten HA-Nahrung HA3 handelt es sich um ein Produkt, das mit die stärkste Hemmwirkung zeigt. Es wurde *in vitro* ein IC_{50} -Wert von 30 mg Protein/l bestimmt. Die Untersuchungen an den HUVECs ergaben, dass für die gleiche Wirkung ca. doppelt so viel an Probe benötigt wird. Diese schlechtere Hemmwirkung im Zelltest lässt Rückschlüsse darauf zu, dass nur ein Teil der Inhibitoren durch weitere Proteasen abgebaut wird und damit keinen Beitrag zu der ACE-Hemmung in der Endothelzelle liefern. Der größte Teil der in der HA-Nahrung vorhandenen ACE-Inhibitoren wird aber offensichtlich nicht abgebaut. Das gleiche Bild ergab sich für IW.

Auch dieses Peptid hemmte *ex vivo* schlechter, aber dennoch deutlich und bei einem IC_{50} -Wert von 4,5 μM kann noch immer von einem sehr potenten Inhibitor gesprochen werden. Mit der Bestimmung der ACE-Inhibierung *ex vivo* an HUVECs konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse des biologischen Systems den *in vitro* ermittelten ähnlich sind. Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode ist, dass in dem Zellsystem humanes ACE vorliegt, während im *in vitro* Verfahren ACE aus der Kaninchenlunge extrahiert verwendet wird. Die Aktivitäten der beiden ACE-Formen sind nicht vergleichbar, wie die Bestimmung der K_m -Werte zeigt. Um jedoch Aussagen über eine mögliche hypotensive Wirkung von ACE-Inhibitoren treffen zu können, ist es neben anderen wichtig auch den hemmenden Effekt auf das humane ACE zu kennen. Ein weiterer Nutzen des *ex vivo* Verfahrens ist die der Ablauf der enzymatischen Reaktion in der intakten Zelle. Damit werden Vorgänge, die auch im lebenden Organismus ablaufen, wie beispielsweise die Wirkung weiterer Proteasen, sowie Matrixeffekte die die Bindung des Inhibitors am Enzym behindern könnten, mit berücksichtigt. Kann bei der *ex vivo* ACE-Aktivität eine starke Hemmung des Enzyms ermittelt werden, können auch hypotensive Effekte im Organismus nicht ausgeschlossen werden. Auch wenn Dipeptide im Allgemeinen im Gastrointestinal-Trakt resorbiert werden, so ist die eigentliche Resorptionsrate noch nicht geklärt. Offen ist ferner, ob es anschließend zu einem Verdau der Peptide in den Enterocyten kommt. Zur endgültigen Aufklärung einer physiologischen Wirkung, sowie Auswirkungen einer langfristigen Aufnahme, wurden nachfolgend Fütterungsstudien am Tiermodell durchgeführt.

4.9 Fütterungsstudien an spontan hypertensiven Ratten (SHR)

Die vorhergehenden Untersuchungen zeigten, dass stark ACE-inhibierende Peptide in den hypoallergen Sänglingsnahrungen vorliegen. Des Weiteren ergaben die Studien am humanen Zellsystem (HUVECs) den Nachweis, dass einige ausgewählte Peptide ebenfalls einen hemmenden Effekt *ex vivo* aufweisen. Ebenso zeigte die untersuchte HA-Nahrung (HA3) eine Inhibierung des humanen ACE, wenn auch leicht verringert. Die für die Hemmung verantwortlichen Verbindungen sind demnach zum Großteil resistent gegen weitere proteolytisch wirkende Enzyme und binden damit an das ACE, welches an der luminalen Oberfläche der Endothelzelle lokalisiert ist. Um schließlich mögliche physiologische Auswirkungen diskutieren zu können, waren Studien *in vivo* nötig. Dies geschah mittels einer Fütterungsstudie an spontan hypertensiven Ratten, da nur so die komplexen Zusammenhänge der Blutdruckregulationsmechanismen, wie sie auch im humanen Kreislauf vorliegen, untersucht werden können. Im nachfolgenden soll der

Versuchsablauf kurz umrissen werden und die erhaltenen Ergebnisse dargestellt, sowie diskutiert werden.

4. 9. 1 Allgemeiner Ablauf der Fütterungsstudie

Für diese Pilotstudie wurden 48 Tiere beantragt, um mögliche signifikante Unterschiede aufzeigen zu können. Aus organisatorischen Gründen wurden zunächst 16 Tiere für die Untersuchungen herangezogen und nach Ablauf der 15wöchigen Versuchsreihe die restlichen 32 in einer nachfolgenden Versuchsreihe. Dadurch wurden für die Studien Tiere aus unterschiedlichen Würfen verwendet. Zwar handelt es sich bei diesem Tier um ein Inzuchtmodell, allerdings kann es laut Hersteller (Charles River) dazu kommen, dass die Bluthochdruckentwicklung nicht immer gleich verläuft. Daher zeigen Tiere aus unterschiedlichen Familien, auf Grund von minimalen Gendrifts in den Inzuchtstämmen, neben anderen Veränderungen auch Unterschiede in der Bluthochdruckentwicklung. Allerdings hat dies für die Studie keine Auswirkungen, da in jeder Versuchsreihe eine Kontrollgruppe mitgeführt wurde, die keinen Futterzusatz bekam und somit den regulären Blutdruckverlauf dieser Familie darstellte.

Wie auch in Kapitel 3.15 beschrieben, wurden die Tiere in vier Gruppen eingeteilt, die jeweils einen unterschiedlichen bzw. keinen Zusatz in ihren Futterpellets hatten. In den ersten Wochen erhielten alle Tiere das gleiche Futter, ohne Zusatz, bis sie ein Lebensalter von 12 Wochen erreicht hatten. Zu diesem Zeitpunkt waren die Tiere nach dreiwöchiger Eingewöhnung an die Versuchsdurchführung (Personen, Blutdruckmessung am Schwanz, Erwärmung, usw.) gewöhnt. Die Einteilung mit entsprechendem Futterzusatz ist in Tabelle 4.9.1-1 zu sehen.

Tabelle 4.9.1-1: Einteilung der Versuchsgruppen und entsprechender Futterzusatz

Gruppenname	Futter
Captopril (positiv Kontrolle)	Re-Pelletiertes Futter mit 0,07% Captopril
Placebo (negativ Kontrolle)	Re-Pelletiertes Futter ohne Zusätze
HA 3	Re-Pelletiertes Futter mit 20% Probe 3 (HA-Nahrung)
KN 3	Re-Pelletiertes Futter mit 21% konventioneller Säuglingsnahrung

Nachfolgend wird auf die einzelnen Parameter der Fütterungsstudie, wie Tiermodell, Futter und Blutdruckmessung detaillierter eingegangen.

Tiermodell

Bei spontan hypertensiven Ratten handelt es sich um ein etabliertes Inzuchtmodell zur experimentellen Untersuchungen der Hypertonie (vgl. Kapitel 2.5.2). Daher wurde auch in dieser Arbeit zu diesem Tierstamm gegriffen. Bei den Tieren entwickelt sich nach ca. 10-12 Wochen (Angaben des Züchters, Charles River) ein krankhaft hoher arterieller Blutdruck mit systolischen Werten zwischen 200-250 mm Hg. Damit verbunden sind im Laufe der Zeit weitere Folgekrankheiten, wie sie auch beim Menschen zu beobachten sind. Häufig kann es zu einem akuten Koronararterienverschluss und einem daraus resultierenden Herzinfarkt kommen. Die degenerativen Veränderungen der Gefäße (Atherosklerose) führen u. a. zu einem hohen transmuralen Druck, dadurch wiederum treten Blutungen in lebenswichtigen Organen auf, welche beispielsweise im Falle einer Hirnblutung einen Schlaganfall zur Folge haben können (*Int. Society of Hypertension, 2003*). Auf Grund des ähnlichen Krankheitsverlaufes ist es möglich, ähnliche physiologische Auswirkungen der Futterzusätze auf den hypertonen Patienten zu übertragen.

Futter

Die Tiere wurden in vier Gruppen eingeteilt, denen jeweils unterschiedliches Futter verabreicht wurde. Die Placebogruppe erhielt keinerlei Beimischung in ihr Futter. Der Kontrollgruppe wurde Captopril, ein häufig eingesetztes Pharmazeutikum zur Behandlung von Hypertonie, zugeführt. Die beiden anderen Gruppen erhielten als Futterzusatz die auch schon in den vorhergehenden Untersuchungen verwendete HA-Säuglingsnahrung (Probe 3 = HA 3), in der neben anderen (siehe Kapitel 4.2) der starke ACE-Inhibitor IW identifiziert wurde. Um auszuschließen, dass auch Säuglingsnahrungen, in denen intaktes Protein als Eiweißquelle eingesetzt wird, durch den gastrointestinalen Verdau ebenfalls eine hypotensive Wirkung hervorrufen könnte, wurde die analog im Handel angebotene Anfangsmilch (KN 3) vom gleichen Hersteller als weiterer Futterzusatz für eine Gruppe gewählt. Damit kann ermittelt werden, ob mögliche physiologische Effekt nicht durch weitere Bestandteile der Säuglingsnahrungen, die annähernd identisch sind, ausgelöst werden. Eine genaue Gegenüberstellung der Inhaltsstoffe dieser Nahrungen ist im Kapitel 3.1 zu finden. Die prozentuale Beimischung wurde im Falle der Säuglingsnahrungen so gewählt, dass für beide Proben eine gleiche Proteinaufnahme gewährleistet wurde. Des Weiteren musste auf die technologische Prozessführung des Futterherstellers Rücksicht genommen werden. Da das Futter in Pellets verabreicht wird, denn dies bevorzugen die Nager, konnte nur ein bestimmter Anteil (max. 20-25% laut Herstellerangaben – Ssniff) in das Futter eingearbeitet werden, damit gewährleistet werden konnte, dass die Pelletform wieder erreicht wird. Die

Konzentration des Pharmazeutikums Captopril im Futter wurde zum einen anlehnend an Literaturwerte bestimmt und zum anderen so gewählt, dass sichergestellt werden konnte, dass es zu keinen negativen Auswirkungen auf Grund zu hoher Medikamentendosis kommen konnte. *Dupius et al.* beispielsweise verwendeten in ihren Studien für die Positivkontrolle 100 mg Captopril/kg Körpergewicht pro Tag, andere Untersuchungen nahmen dagegen nur 10 mg/kg KG (*Dupius et al.*, 2005; *Da Costa et al.*, 2007). Für die hier diskutierte Studie wurden 70 mg Captopril pro kg Körpergewicht gewählt. Die exakten prozentualen Zusätze sind in Tabelle 4.9.1-2 angegeben. Die unterschiedlich zusammengesetzten Futterpellets wurden mit verschiedenen unresorbierbaren Farbstoffen angereichert, so dass es nicht zu Verwechslungen während des Futterwechsels kommen konnte und die Tiere immer den ihrer Gruppe entsprechenden Zusatz bekamen.

Nachdem die Nager sich innerhalb von drei Wochen an die neue Umgebung gewöhnen konnten bevor die eigentlich Fütterungsstudie begann, reagierten sie auf die Umstellung der Nahrung zunächst mit leichtem Durchfall, was sich allerdings innerhalb einer Woche wieder normalisierte. Das Futter wurde ebenfalls wie das Wasser ad libitum angeboten, so dass die Nager beliebig viel zu sich nehmen konnten. Dadurch ist es schwierig, exakte Angaben über die Absorption des Futterzusatzes zu machen, sowie auch über die zeitliche Aufnahme und damit die Wirkstoffverteilung im Organismus vor der Blutdruckmessung. Daher war es nur möglich, Durchschnittsangaben für die Gruppe zu treffen. Auswägen des Futters ergaben, dass ein Tier im Schnitt ca. 35 g Futter pro Tag zu sich genommen hat, egal um welches Futter es sich handelte, obwohl allgemein nur eine Aufnahme von etwa 20 g Futter pro Tag und Tier erwartet wurde (persönliche Mitteilung; Tierarzt Dr. Jung). Damit kann davon ausgegangen werden, dass keiner der Zusätze eine negative geschmackliche Veränderung mit sich bringt. Tabelle 4.9.1-2 zeigt, mit welchen Aufnahmemengen an entsprechendem Zusatz pro Tier (Gewicht ca. 350 g) pro Kilogramm Körpergewicht und Tag annähernd zu rechnen ist. Außerdem ist dargestellt, wie viel ein Säugling (Gewicht ca. 3400 g) in den ersten Lebenswochen pro Kilogramm Körpergewicht und Tag laut Herstellerangaben zu sich nehmen sollte. Aus der Tabelle wird ersichtlich, dass die Tiere bezogen auf die Proteinmenge pro kg Körpergewicht und Tag die minimale Proteinmenge aus der HA-Nahrung zu sich nehmen, wie es der Hersteller für einen Säugling in der ersten Lebenswoche mindestens empfiehlt. Da der Nährstoffbedarf des Kindes besonders in den ersten Wochen stetig steigt, erhöht sich der Gehalt an potenziellen hypotensiven Peptiden aus den HA-Nahrungen, die ein Säugling aufnimmt, ebenfalls wöchentlich.

Tabelle 4.9.1-2: Tägliche Aufnahme des entsprechenden Futterzusatzes für SHR, sowie die für Säuglinge vom Hersteller empfohlenen Menge in g/kg KG und Tag

	Aufnahme pro kg KG/d
SHR: Captopril	0,07 g Captopril
SHR: Placebo	Kein Zusatz
SHR: HA 3	20 g HA Nahrung entspricht 2,4 g Proteinzusatz aus HA-Nahrung
SHR: KN 3	21 g konventionelle Säuglingsnahrung entspricht 2,4 g Proteinzusatz aus konventioneller Nahrung
Säugling: HA-Nahrung	1. Woche: 2,4 g – 3,4 g Protein 2. Woche: 3,2 g – 3,9 g Protein
Säugling: konventionelle Nahrung	1. Woche: 1,7 g – 2,3 g Protein 2. Woche: 2,5 g – 3,0 g Protein

Bezogen auf das potenteste Inhibitor-Peptid, welches in der hypoallergenischen Säuglingsnahrung HA3 quantifiziert wurde, nimmt ein Nager bzw. ein Säugling mindestens 1,6 mg IW pro kg Körpergewicht jeden Tag auf. Dies ist eine beachtliche Menge, wenn man den IC_{50} -Wert des Dipeptids von nur 0,22 mg/l bedenkt. Es kann zwar nicht von einer 100%igen Resorptionsrate des Peptides ausgegangen werden, doch schon eine 14% Aufnahme, bei angenommener homogener Verteilung im Körperwasser, würde für eine 50%ige Hemmung der ACE-Aktivität ausreichen. Da Proteine bzw. Peptide allgemein im Gastrointestinal-Trakt zu fast 95% aufgenommen werden, wäre die oben genannte nötige Resorptionsrate von 14% für IW nicht abwegig. Allerdings handelt es sich bei der oben genannten Konzentration nicht um eine einmalige Aufnahme, sondern um eine über den Tag verteilte. Besonders bei den Ratten, die keine geregelten Fütterungszeiten haben, kommt es zu einer ständigen Aufnahme an antihypertensiven Peptiden. Für einen Säugling ist diese Konzentration auf fünf bis sieben Portionen am Tag aufgeteilt. Das heißt, dass es zwar zu einer kontinuierlichen Zufuhr kommt, aber auch ein bestimmter Abbau durch Peptidasen sowie Ausscheidungs- und Eliminationsprozesse nicht zu vernachlässigen ist.

Blutdruckmessung

Die Blutdruckmessung wurde über die Cuff-Methode nichtinvasiv an der wachen Ratte durchgeführt. Dabei wird das Tier in ein Rohr platziert und in einen Wärmekäfig bei einer Temperatur von ca. 35°C gelegt. Die Messung erfolgte am Schwanz der Ratte. Dabei wurden an diesem eine Blutdruckmanschette und ein Pulssensor ähnlich der Messung am Arm eines

Menschen, angebracht. Durch die Temperaturzufuhr kommt es zu einer geringfügig gesteigerten Körpertemperatur des Nagers, so dass eine erhöhte Durchblutung des Schwanzes herbeigeführt und damit eine Pulswertbestimmung ermöglicht wird. Erst wenn dies erreicht wird, kann die eigentliche Blutdruckmessung erfolgen. Dies war in der Regel nach ca. fünf bis sieben Minuten der Fall. Diese Technik der Blutdruckmessung entspricht vom Prinzip, wie schon oben angesprochen, derjenigen, die beim Menschen mittels Blutdruckmanschette am Arm durchgeführt wird, allerdings wird hier auf eine Temperaturerhöhung verzichtet. Die Messungen erfolgten je Tier mindestens fünfmal und wurden anschließend gemittelt. Durch eine relativ lange Eingewöhnungszeit vor Beginn der eigentlichen Studie war es möglich, die Tiere auch während der nötigen Erwärmung ruhig zu halten, damit die Werte nicht durch motorische Aktivitäten verfälscht werden. Dennoch kommt es natürlich auf Grund von äußeren Einflüssen immer zu Schwankungen, so dass alle Messungen zweimal pro Woche jeweils zur gleichen Zeit bestimmt wurden. Obwohl möglichst wenig Stress für die Tiere während der Messung auftrat, verstarben zwei Tiere der kompletten Versuchsreihe nach einer Blutdruckbestimmung und eine Ratte verstarb in der Tierhaltung. Auf Grund des krankhaft hohen Blutdruckes der Tiere, kann es, wie schon oben beschrieben, zu diversen Folgeerkrankungen, wie Atherosklerose und darauf folgend zu Blutungen in lebenswichtigen Organen oder akutem Gefäßverschluss (Thrombose) kommen. Eine durchgeführte Sektion der drei Tiere ließ schlussfolgern, dass die SHRs an einer akuten Herzinsuffizienz verstorben waren. Für den Verlauf der Studie und die Interpretation der Ergebnisse spielt dies allerdings nur eine untergeordnete Rolle, da die verstorbenen Ratten jeweils zu unterschiedlichen Futtergruppen zählten. Es bestand kein Unterschied in der Mortalitätsrate der einzelnen Gruppen. Das unten dargestellte Schema fasst den Ablauf der Fütterungsstudie zusammen.

Nachfolgend sollen die Ergebnisse der Blutdruckmessungen je Versuchsreihe diskutiert werden.

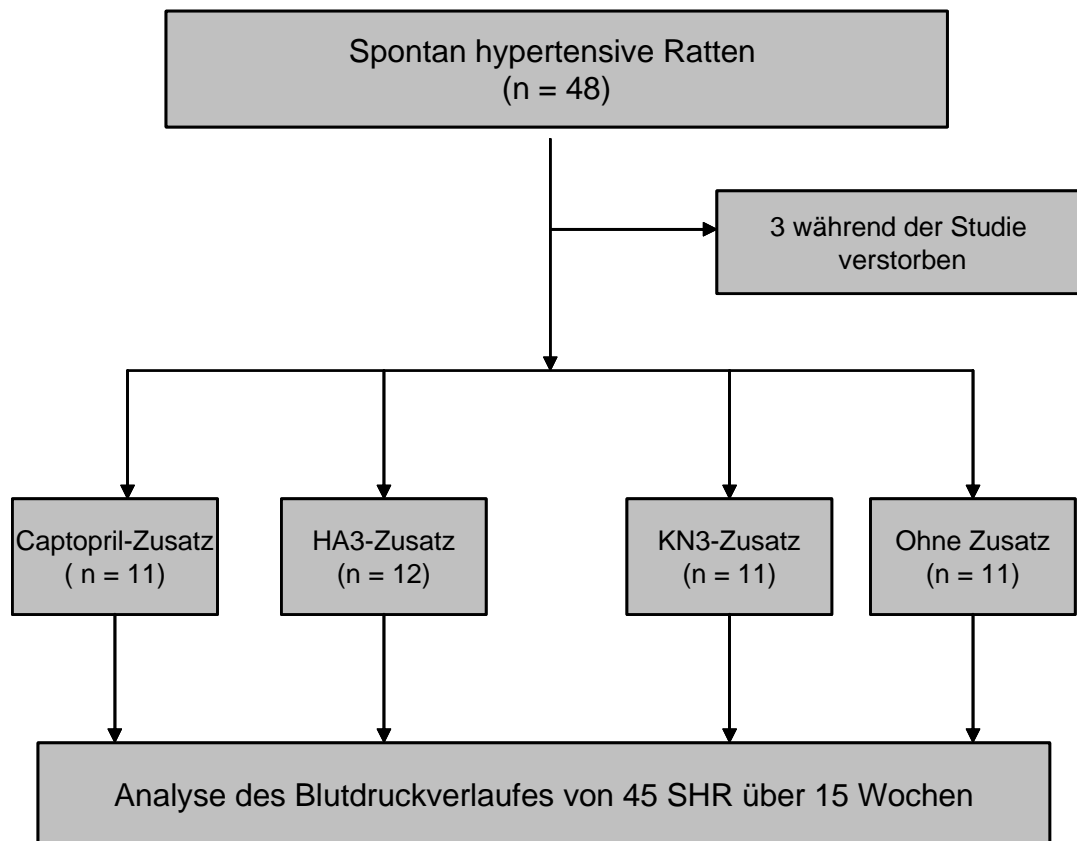


Abbildung 4.9.1-1: Schematischer Verlauf der Fütterungsstudie an SHR

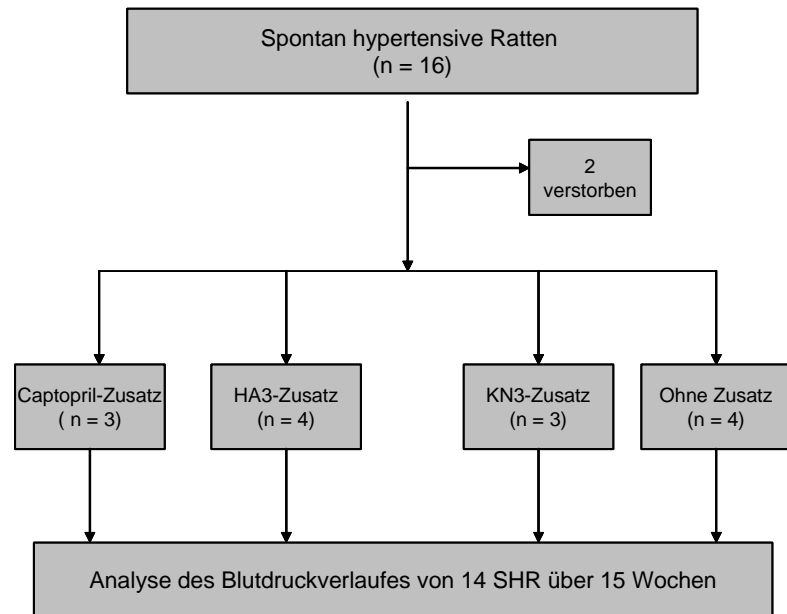
4. 9. 2 Fütterungsstudien zur Blutdruckentwicklung

Wie schon kurz umrissen mussten die Tiere aus organisatorischen Gründen in mehrere Versuchsreihen eingeteilt werden. Es wurden drei Versuchsreihen mit je 16 Tieren gewählt. Zunächst wurde mit 16 Nagern der Reihe 1 begonnen. Versuchsreihe 2 und 3, ebenfalls mit je 16 Tieren, folgten danach. Dadurch wurden Tiere aus unterschiedlichen Familien verwendet, was sich in der Bluthochdruckentwicklung bemerkbar machte. Die SHR wurden zufällig in Gruppen zu je vier Ratten pro Käfig eingeteilt und auch die Wahl des Futters erfolgte per Los. Die Gewichtszunahme während der Studie war bei allen Tieren ähnlich, unabhängig davon in welche Fütterungsgruppe sie eingeteilt wurden. Durchschnittlich nahm ein Nager ca. 100 g zu, wobei dies besonders in den ersten Wochen der Fall war und ein Körpergewicht von ungefähr 350 g nicht überschritten wurde. Es erschien zwar während der Messung, als würden jeweils die SHR, denen Captopril bzw. HA-Nahrung in das Futter beigemischt wurde, agiler sein, allerdings konnten bei einem Vergleich der Messzeiten mit den beiden anderen Gruppen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Auch die während der Messung aufgezeichneten Herzfrequenzen zeigten keine eindeutigen Unterschiede zwischen den Gruppen, so dass auch diese hier nicht diskutiert werden. Nach Ablauf der Fütterungszeit

wurden alle Tiere getötet und weitere Untersuchungen an den isolierten Organen durchgeführt. Auf diese Ergebnisse wird in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht weiter eingegangen. Nachfolgend werden die Ergebnisse für die Versuchsreihen der unterschiedlichen Würfe einzeln dargestellt, interpretiert und abschließend eine Zusammenfassung der Studie gegeben sowie die Schlussfolgerungen diskutiert.

4. 9. 2. 1 Versuchsreihe 1

In dieser Versuchsreihe wurden 16 SHR im Alter von 9 Wochen zufällig zu je vier Tieren in Käfige aufgeteilt und zunächst drei Wochen mit normalem Futter, ohne jegliche Zusätze versorgt. Während dieser drei Wochen hatten die Tiere Zeit, sich an die neue Umgebung anzupassen und sich an die Prozedur der Blutdruckmessung



zu gewöhnen. Die Eingewöhnung und anschließende Messungen wurden neben Frau Zatschler (MTA, Institut für Physiologie, TU-Dresden), persönlich über die komplette Studie durchgeführt, da die Tiere ein Vertrauensverhältnis aufbauen und nur dadurch eine ruhige Messung gewährleistet werden konnte. Nach den drei Wochen Eingewöhnung wurde das Futter gewechselt, so dass jede Gruppe den entsprechenden Zusatz aufnahm. Auf die neue Nahrung reagierten die SHR zunächst mit leichtem Durchfall, was sich allerdings nach einer Woche wieder legte. Der zugesetzte inerte Farbstoff zur besseren Überprüfung der korrekten Fütterung wurde vom Körper wieder vollständig ausgeschieden.

Zu Beginn der Fütterungsstudie verstarben zwei Tiere im Alter von 10 bzw. 12,5 Wochen. Es fanden sich pathologisch keine Organauffälligkeiten, eine beobachtete Schaumbildung im Maul der Tiere deutet auf die Entstehung eines Lungenödems hin. Es kann davon ausgegangen werden, dass beide Ratten an akutem Herz-Kreislaufversagen gestorben sind, was für die Tiere auf Grund ihrer genetischen Vorbelastung nicht ungewöhnlich ist. Dementsprechend lagen in der Captopril-Gruppe sowie in der Gruppe, in deren Futter die konventionelle Säuglingsnahrung KN3 eingearbeitet wurde, nur noch drei anstelle von vier Tieren in dieser Versuchsreihe vor. Die Messungen wurden wie oben beschrieben immer zur

gleichen Tageszeit zweimal pro Woche durchgeführt. Die erhaltenen Blutdruckwerte wurden für jedes Tier pro Gruppe gemittelt. Daraus resultiert die in Abbildung 4.10.2.1-1 dargestellte Blutdruckentwicklung während der Fütterungszeit. Der gemittelte systolische Blutdruck wurde für jede Messung und Gruppe gegen das Alter der SHR aufgetragen.

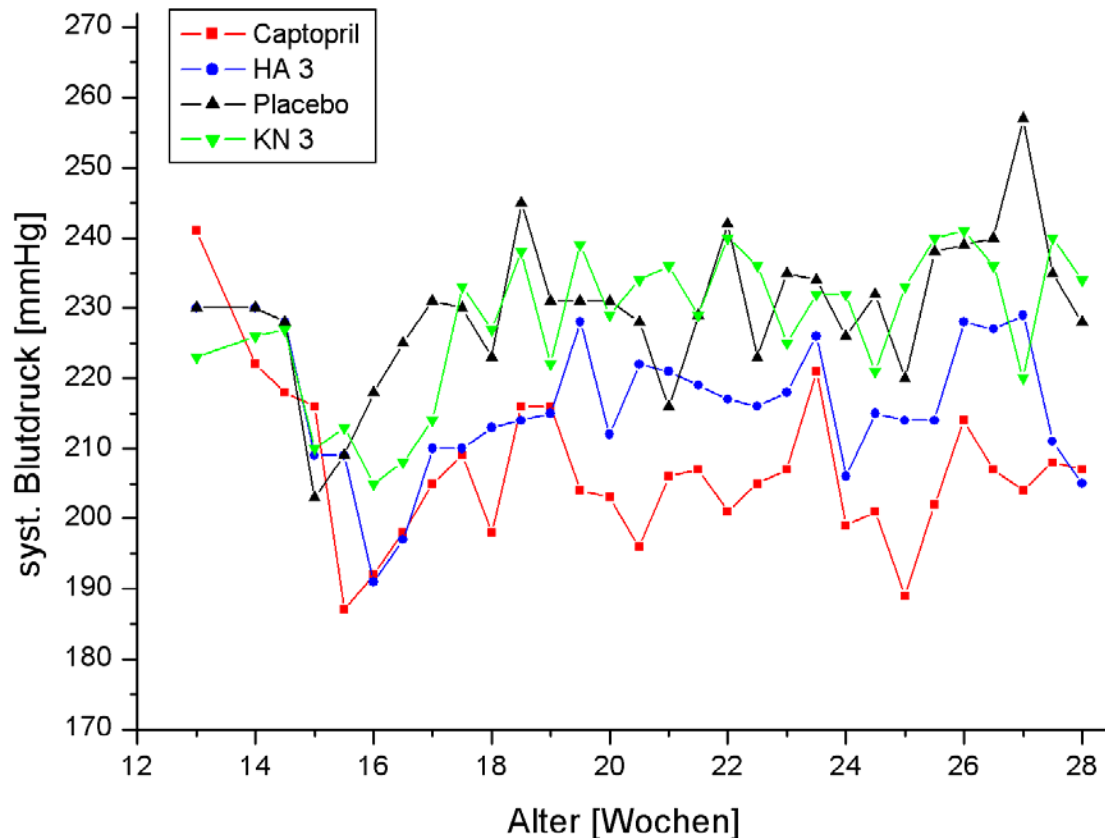


Abbildung 4.9.2.1-1: Verlauf der Blutdruckentwicklung der SHR-Versuchsreihe 1 über 15 Wochen Fütterung mit unterschiedlichen Zusätzen

Noch zu Beginn der Studie, im Alter von 12,5 bis 14,5 Wochen liegen die ermittelten systolischen Blutdruckwerte aller Tiere in ähnlichen Bereichen. Erst nach einer Applikationsphase von ca. drei Wochen zeigen die Futterzusätze die ersten differenzierbaren Effekte. Nur die drei Tiere, die Captopril aufnahmen, zeigen schon anfangs einen leichten Abfall des Blutdruckes, der stetig abnahm. Allerdings wurde in den ersten Wochen der Studie grundsätzlich für alle Tiere ein leichter Abwärtstrend verzeichnet. Demgegenüber stiegen die Werte für die SHR ohne Futterzusatz sowie auch für die, in deren Pellets die konventionelle Säuglingsnahrung KN3 beinhaltet war, wieder an und blieben in ähnlichen Bereichen bei einem durchschnittlichen Blutdruck von 230 mm Hg. Das bedeutet, dass durch die Zufuhr des konventionellen Produktes keine Blutdruckveränderungen erreicht wurden. Offensichtlich reichen die durch die Hydrolyse der Verdauungsenzyme gebildeten ACE-Inhibitoren nicht für

einen hypotensiven Effekt aus. Es besteht des Weiteren die Möglichkeit, dass schlechter resorbierbare Peptide gebildet werden bzw. die hier vorliegenden Peptid-Inhibitoren sehr leicht durch Proteasen in den Enterocyten zu den entsprechenden Aminosäuren hydrolysiert werden. Die Gruppe, deren Futter den synthetischen ACE-Hemmer Captopril enthielt, zeigte wie zu erwarten die stärkste Veränderung. Diese Gruppe diente als Kontrollgruppe für die Studie, da mit dem Pharmazeutikum eine Blutdruckabsenkung erwartet werden musste. Diese Wirkung konnte auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Schon zu Beginn der Applikation sank der Blutdruck leicht ab. Im Mittel wurden Blutdruckwerte von 200 bis 210 mm Hg gemessen. Damit wurde der Blutdruck um durchschnittlich -29 mm Hg abgesenkt. Ein ähnlicher Trend konnte für die Gruppe, welche anteilig die hypoallergene Säuglingsnahrung aufnahm, erzielt werden. Allerdings zeigte sich hier der Abfall nicht so drastisch, aber dennoch sehr deutlich mit durchschnittlich -15 mm Hg. Das heißt, dass die Inhaltsstoffe der HA-Probe 3 eindeutig einen hypotensiven Effekt aufweisen.

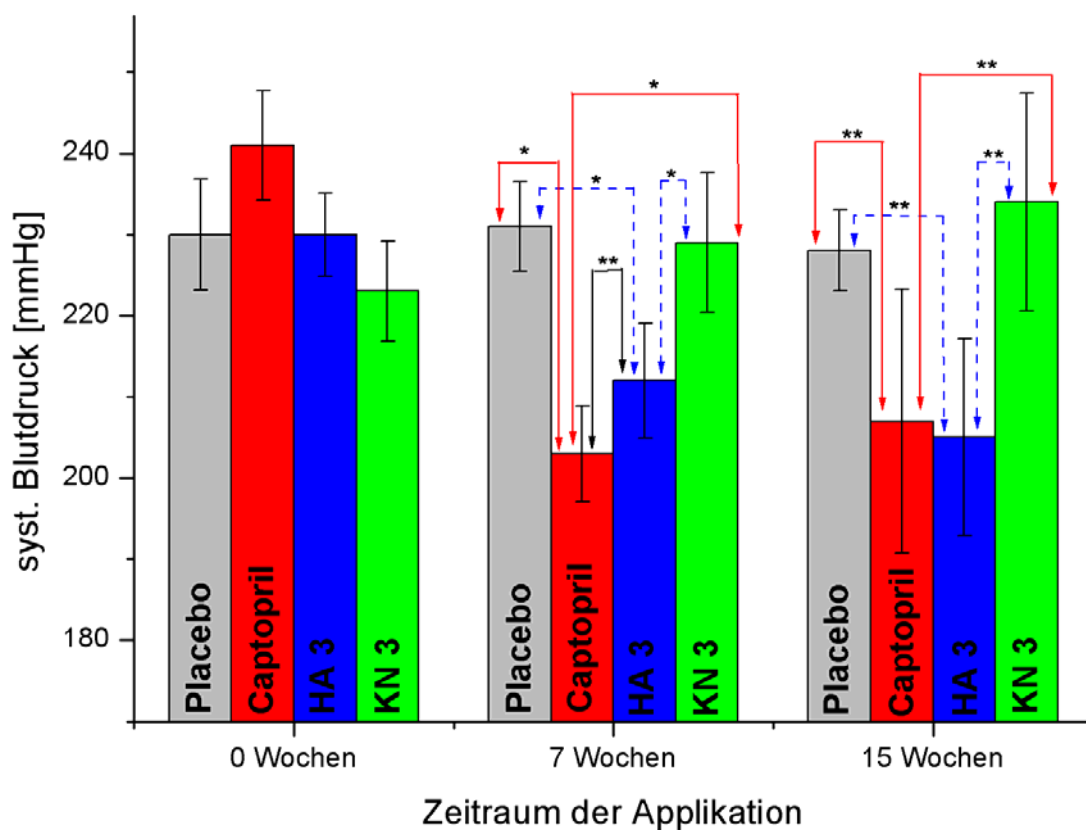


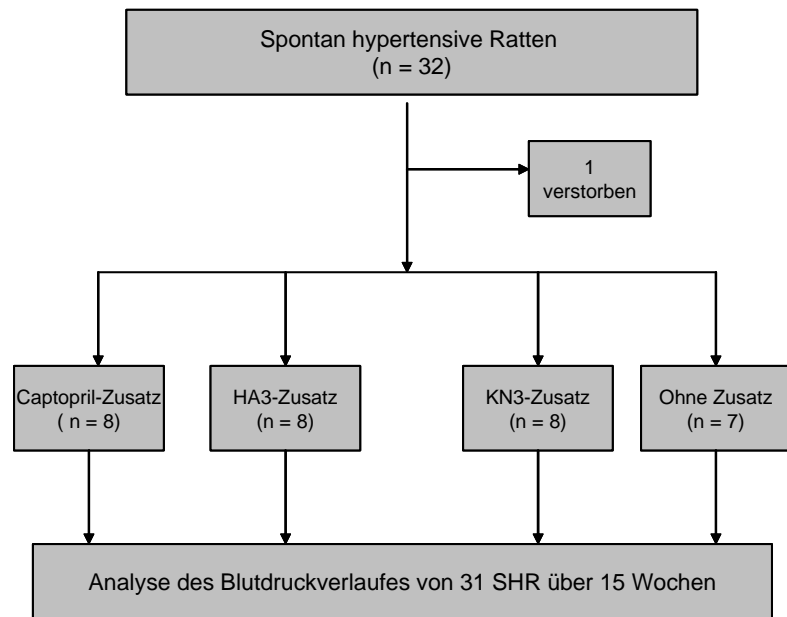
Abbildung 4.9.2.1-2: Darstellung des systolischen Blutdruckes [mm Hg] der vier Gruppen aus Versuchsreihe 1 zu Beginn, nach 7 Wochen und am Ende der Fütterungsstudie mit den entsprechenden Vertrauensintervallen sowie Bestimmung der signifikanten Unterschiede mit * $p < 0,001$ bzw. ** $p < 0,05$

Sie werden offensichtlich im Gastrointestinaltrakt ausreichend resorbiert und gelangen auch intakt an den Wirkort, wo sie das ACE hemmen. Deutlich wird dieser Verlauf auch in Abbildung 4.9.2.1-2 dargestellt. Hier sind die Mittelwerte der systolischen Blutdrücke mit entsprechender statistischer Auswertung für den Beginn der Studie, die Mitte und das Ende der Zufütterung für jede Gruppe der Versuchsreihe 1 abgebildet. Zu Beginn der Studie konnten keine signifikanten Unterschiede in der Blutdruckentwicklung zwischen den verschiedenen Gruppen bestimmt werden. Die Placebogruppe zeigte auch nach siebenwöchiger Messzeit keine signifikante Veränderung in der Blutdruckentwicklung, was sich auch bis zum Ende der Studie nicht änderte. Den gleichen Verlauf zeigten auch die Tiere, denen die konventionelle Säuglingsnahrung KN3 verabreicht wurde. Deren Blutdruckwerte nahmen sogar im Laufe der Studie im Vergleich mit dem Ausgangswert leicht zu, aber ohne Signifikanz. Dagegen zeigt die HA3-Gruppe eine deutliche Veränderung in der Blutdruckentwicklung wie schon vorher diskutiert. Zu Beginn der Studie wurde ein dem der Placebogruppe identischer Wert bestimmt, der doch im Laufe der Zeit deutlich abnahm. Schon nach siebenwöchiger Applikation der HA-Nahrung wurden signifikante Unterschiede zu allen anderen Gruppen festgestellt. Dieser Effekt hielt auch während des weiteren Verlaufes an, nur der Unterschied zwischen der HA- und der Captopril-Gruppe war nicht mehr so groß, dass eine Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5% vorliegen würde. Es konnten zum Zeitpunkt der 15wöchigen Aufnahme sogar annähernd gleiche Blutdruckwerte der Tiere in der HA- und Captopril-Gruppe gemessen werden. Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass der Blutdruckausgangswert für die Captopril-Gruppe um 11 mm Hg deutlich höher lag. Diese Gruppe startete mit dem höchsten systolischen Blutdruck von 241 mm Hg, doch schon nach kurzer Zeit wurde die Wirkung des Arzneimittels sichtbar und nach sieben Wochen Applikation zeigte sich ein Abfall des Blutdruckes um -38 mm Hg. Dieser Wert wurde im weiteren Verlauf wieder leicht erhöht und nach 15 Wochen konnte ein Abfall von -34 mm Hg ermittelt werden. Die Tiere, denen das Pharmazeutikum verabreicht wurde, zeigten durchgehend signifikante Unterschiede zu den anderen Gruppen, nur wie schon in der Diskussion der HA-Applikation erwähnt nicht nach 15 Wochen zu der HA-Gruppe.

Damit konnte gezeigt werden, dass die hemmende Wirkung durch die Aufnahme von Captopril bzw. der HA-Nahrung im Verlauf der Studie signifikant unterschiedlich zu den entsprechenden Ausgangswerten des Blutdruckes und jeweils zu den anderen beiden Gruppen ist. Es tritt also kein Gewöhnungseffekt auf, der einen Wiederanstieg des Blutdruckes bewirkt hätte. Ebenso bleiben die hohen Blutdruckwerte für die KN3- und Placebogruppe konstant.

4. 9. 2. 2 Versuchsreihe 2 und 3

Diese beiden Versuchsreihen (je 16 Tiere pro Reihe) können zusammen ausgewertet werden, da die Tiere in diesem Fall zu einer Familie gehörten. Es wurden nur zwei Reihen eingeteilt, da pro Käfig nur vier Tiere gehalten werden konnten. Der gesamte Ablauf des Tierexperiments verlief analog Versuchsreihe 1. Auch in Versuchsreihe 2 verstarb ein



Tier an akutem Herz-Kreislaufversagen. Der Nager gehörte zu der Placebo-Gruppe und verstarb nach 4,5 Wochen Fütterungszeit, so dass ab diesem Zeitpunkt nur noch drei Tiere in der Gruppe waren. Daher standen statt der 32 SHR nur 31 Tiere für die komplette Analyse der Blutdruckentwicklung zur Verfügung. Abbildung 4.9.2.2-1 zeigt den Verlauf der Blutdruckentwicklung während der Fütterungsstudie mit unterschiedlichen Zusätzen für Versuchsreihe 2 und 3. Bei diesen Tieren entwickelte sich der Bluthochdruck etwas später als in der ersten Versuchsreihe, was zur Folge hatte, dass in den ersten Wochen keine starken Unterschiede in der Blutdruckmessung zu sehen waren. Die Reaktionen auf den Futterwechsel nach der Eingewöhnungszeit waren ähnlich wie in der ersten Versuchsreihe dokumentiert. Nach 16 Wochen Lebensalter zeigte sich der gleiche Trend wie bei der ersten Versuchsreihe. Ab einem Lebensalter von 20 Wochen, was mit einer Fütterungszeit von sechs Wochen einhergeht, wird auch hier ein deutlicher Effekt der HA-Nahrung sowie des Captoprils sichtbar. Beide Substanzen bewirken im Gegensatz zu der SN-Nahrung bzw. kein Zusatz in der Placebogruppe eine deutliche Absenkung des Blutdruckes. Die 8 SHR, die mit ihrem Futter Captopril aufnahmen, zeigten eine durchschnittliche Absenkung des systolischen Blutdrucks von -27 mm Hg, die Gruppe mit HA-Nahrung in den Pellets zeigte analog zur Versuchsreihe 1 einen etwas geringeren Wert von durchschnittlich -12 mm Hg. Damit wurde ein minimal geringerer Abfall des Blutdruckes als in den Tieren der ersten Durchführung erreicht. Der Zeitverlauf war qualitativ allerdings sehr ähnlich und das Verhältnis der Drucksenkung durch die Captopril- bzw. HA-Nahrung Aufnahme ist nahezu identisch wie oben beschrieben.

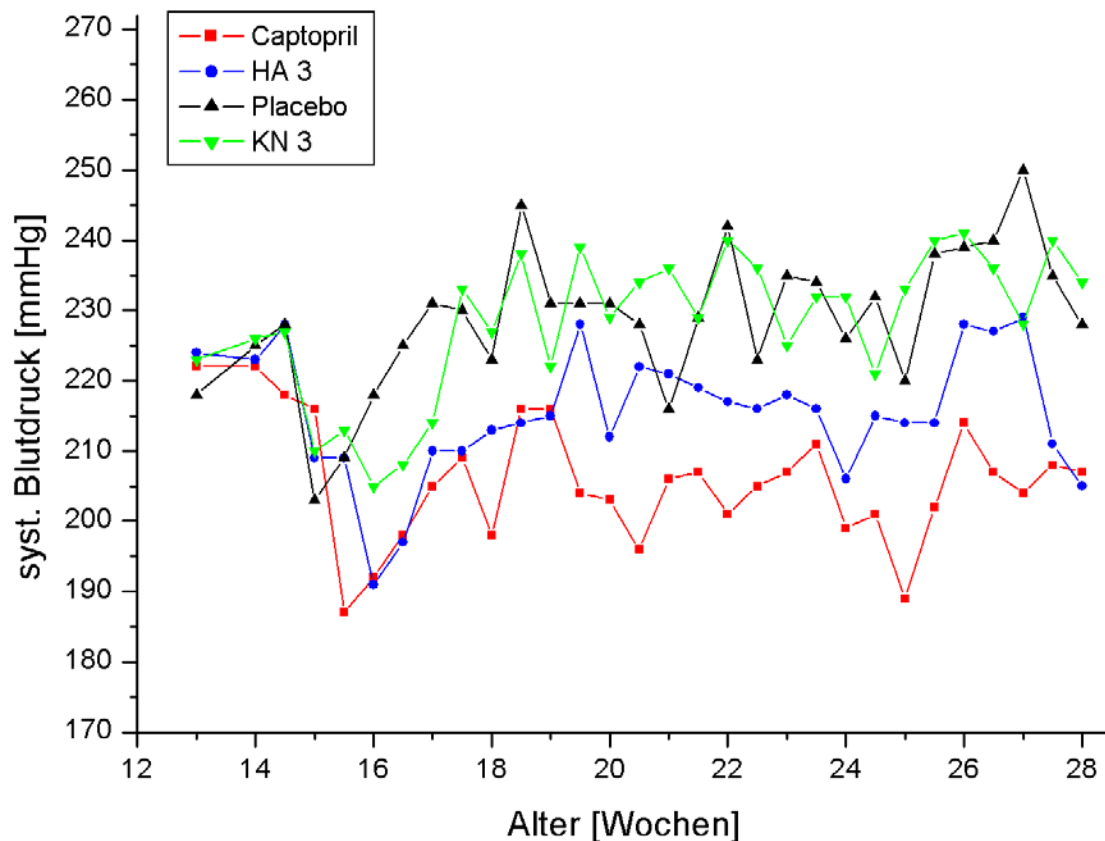


Abbildung 4.9.2.2-1: Verlauf der Blutdruckentwicklung der SHR-Versuchsreihe 2 und 3 über 15 Wochen Fütterung mit unterschiedlichen Zusätzen

Für eine bessere Veranschaulichung der Ergebnisse und zur Verdeutlichung der signifikanten Unterschiede sind auch für diese Nager die Blutdruckwerte zu Beginn, nach sieben Wochen, sowie am Ende der Studie dargestellt.

Daraus werden die nahezu identischen Ergebnisse, die auch schon für Versuchsreihe 1 diskutiert wurden, ersichtlich. Zu Beginn der Studie lagen die Blutdruckwerte der einzelnen Gruppen in annähernd gleichem Bereich. Eine so starke Hypertonie, wie sie in der ersten Versuchsreihe aufgenommen wurde, zeigten diese Tiere allerdings nicht. Im Mittel lagen die Ausgangswerte fast 15 mm Hg unter denen der ersten Reihe. Dennoch konnten die Ergebnisse durch die Aufnahme der unterschiedlichen Zusätze mit diesen Nagern reproduziert werden. Nach siebenwöchiger Aufnahme der HA-Nahrung zeigten sich signifikante Unterschiede zu den Blutdruckwerten am Beginn der Studie, sowie auch zu den jeweiligen anderen Gruppen zum Zeitpunkt null und sieben Wochen Applikation. Nach 15 Wochen wurde eine Absenkung um -21 mm Hg, bezogen auf den Ausgangswert erreicht.

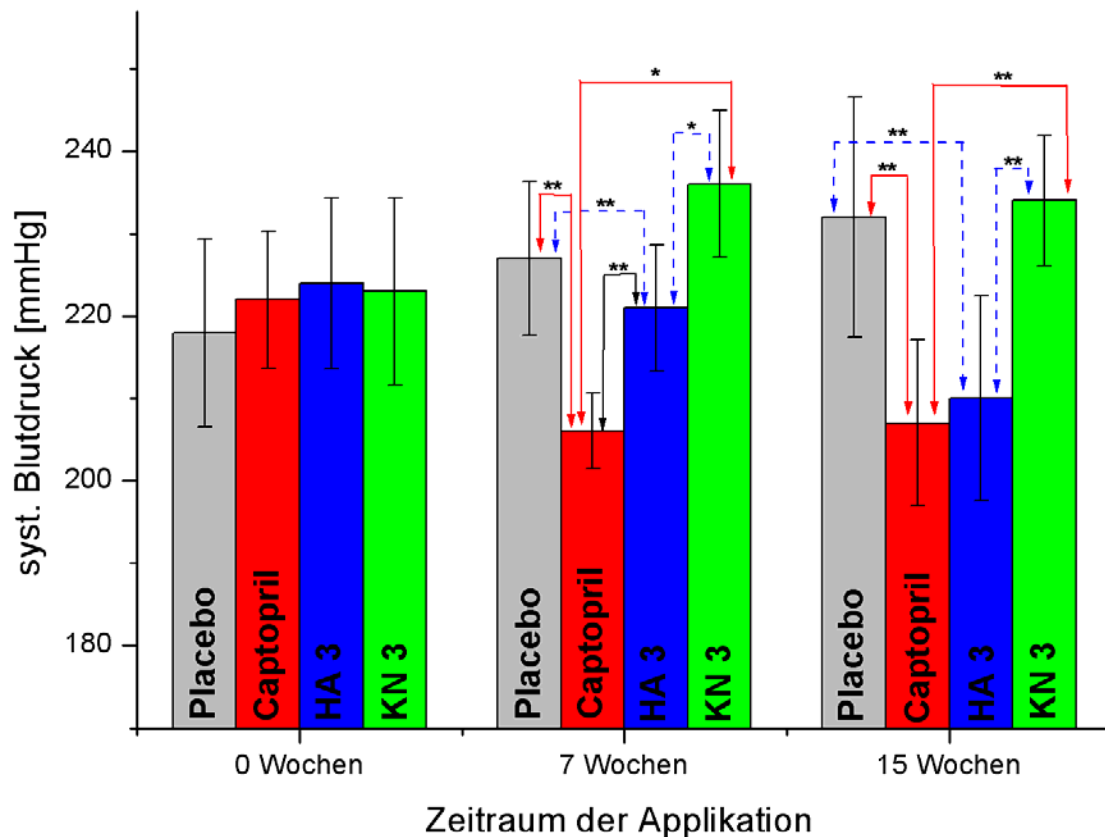


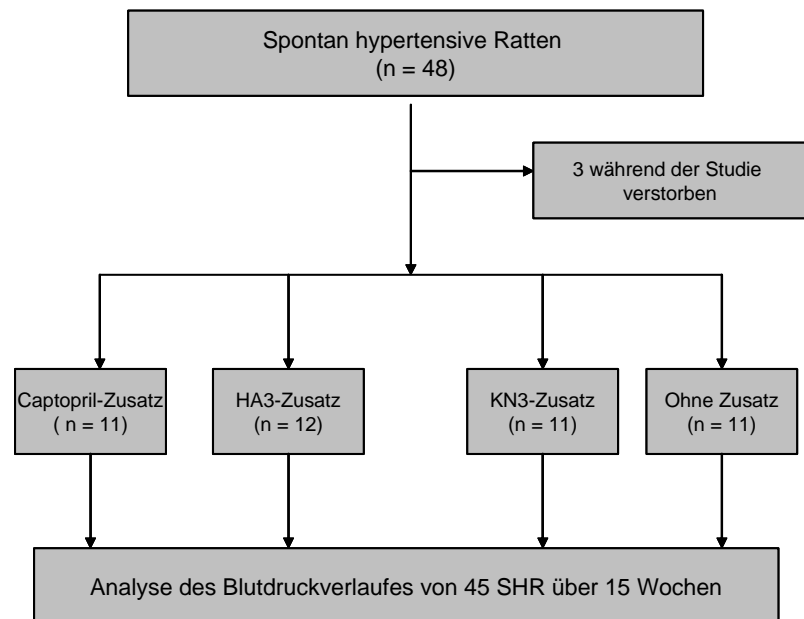
Abbildung 4.9.2.2-2: Darstellung des systolischen Blutdruckes [mm Hg] der vier Gruppen aus Versuchsreihe 2 und 3 zu Beginn, nach 7 Wochen und am Ende der Fütterungsstudie mit den entsprechenden Vertrauensintervallen sowie Bestimmung der signifikanten Unterschiede mit * $p < 0,001$ bzw. ** $p < 0,05$

Der relative Abfall lag nach 15 Wochen fast identisch mit dem der Captopril-Gruppe vor. Zu diesem Zeitpunkt lag die Irrtumswahrscheinlichkeit zwischen diesen beiden Gruppen bei genau 5%, so dass keine Signifikanz mehr zwischen den Werten der beiden Gruppen vorliegt. Die Druckentwicklung der Captopril-Gruppe kann analog zu Versuchsreihe 1 ausgewertet werden. Auch die Tiere in den Reihen 2 und 3 zeigten sowohl signifikante Absenkungen im Vergleich zu den anderen Gruppen als auch zum Ausgangswert des Blutdruckes zu Beginn der Studie. Schließlich zeigten die Tiere, die konventionelle Säuglingsnahrung als Zusatz bzw. die, die keinen Zusatz bekamen, konstant hohe Blutdruckwerte.

Es konnten also die Ergebnisse der ersten Versuchsreihe reproduziert werden, auch wenn bei den Nagern, die aus der zweiten Familie stammten, die Bluthochdruckentwicklung erst später und nicht so extrem einsetzte. Auch die Absenkung des Blutdruckes durch die Applikation von Captopril, oder auch HA-Nahrung ist leicht unterschiedlich, was den verschiedenen Ausgangswerten zugeschrieben werden kann.

4. 9. 3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Fütterungsstudie für alle Versuchstiere

Wie schon in den beiden vorhergehenden Kapiteln diskutiert, führte die Fütterungsstudie bei den Versuchstieren, auch wenn Nager aus unterschiedlichen Familien genutzt wurden, zu identischen Ergebnissen. Daher sollen im Folgenden die Resultate für alle Tiere gemeinsam dargestellt werden. Es konnten die



Werte von insgesamt 45 Tieren zur Auswertung herangezogen werden. Drei Tiere verstarben. Damit waren jeweils in der Captopril-, Placebo- und in der KN3-Gruppe nur elf anstatt zwölf Tiere auswertbar. Da die Bluthochdruckentwicklung in den Versuchsreihen der unterschiedlichen SHR-Würfe verschieden war, kann der Verlauf der Studie nicht mit den Rohdaten des systolischen Blutdruckes dargestellt werden. Daher wurde die Auswertung wie folgt gewählt. Die Werte jedes Messzeitpunktes wurden pro Gruppe gemittelt und als Abweichung vom Ursprungswert als Änderung des systolischen Blutdruckes [mm Hg] in Abbildung 4.9.3-1 dargestellt. Zu Beginn der Studie fällt der Blutdruck für alle Tiere etwas ab. Gründe für diesen Effekt könnten unterschiedlicher Natur sein. Es kann diskutiert werden, dass der Ausgangswert leicht erhöht bestimmt wurde, da die Tiere eventuell trotz intensiver Eingewöhnungsphase an die experimentellen Parameter noch nervös reagierten und damit eine Erhöhung des Blutdruckes bewirkte. Ebenso könnte die Futterumstellung neben den schon erläuterten Verdauungsproblemen, damit verbundene Veränderungen im Flüssigkeitshaushalt und weitere Nebenwirkungen bewirken, die nicht offensichtlich erkennbar sind, aber den Blutdruck der Tiere beeinflussen. Neben diesen Aspekten ist es ebenfalls denkbar, dass die Nager sich nach kurzer Zeit in der neuen Situation besonders wohl fühlten und sich dies blutdrucksenkend auswirkte. Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich wie sehr unspezifische Aspekte den Blutdruck beeinflussen können. Dies unterstreicht die Wichtigkeit einer guten Eingewöhnungsphase der Tiere und entsprechend häufige Messungen, die immer von den gleichen Personen durchgeführt werden sollten.

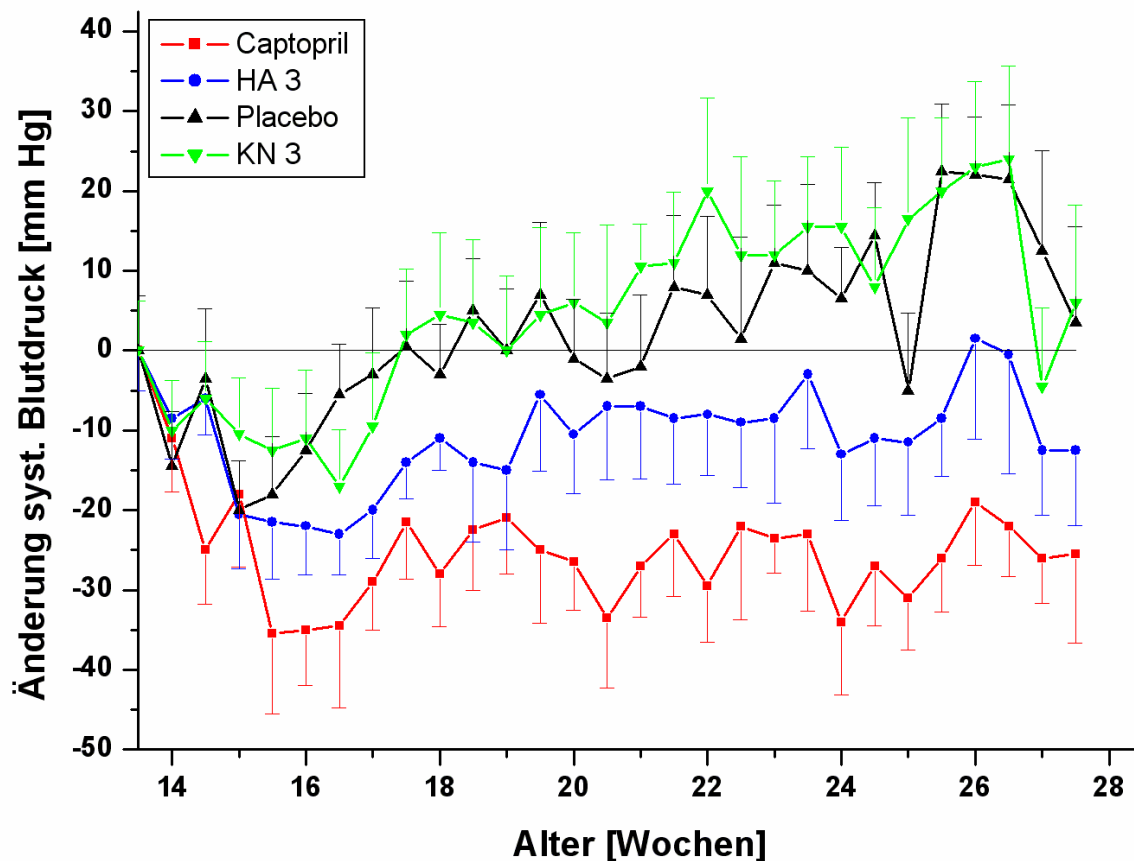


Abbildung 4.9.3-1: Darstellung der Blutdruckabweichung während der Fütterungsstudie für die unterschiedlichen Futterzusatz-Gruppen

Ebenso zeigt es, dass Studien die den Blutdruckverlauf nur über einige Stunden nach Verabreichung der Untersuchungssubstanz ermitteln, kritisch zu bewerten sind. Es finden sich zahlreiche Literaturstellen, die über hypotensiv wirkende Substanzen berichten, aber die Wirkung dieser nur anhand des Blutdruckverlaufes über bis zu zwölf Stunden ermitteln (*Nakamura et al., 1995a und 1995b; Da Costa et al., 2007*). In der hier durchgeführten Studie konnte allerdings gezeigt werden, dass erst nach ca. vierwöchiger Aufnahme der Untersuchungssubstanz ein konstanter Blutdruckverlauf erreicht wurde. Für aussagekräftige Ergebnisse ist es daher wichtig die Blutdruckentwicklung nach Aufnahme einer speziellen Substanz über mehrere Wochen hin zu untersuchen, um eindeutige Angaben über mögliche hypotensive Effekt treffen zu können. Wie schon erwähnt, wurde die Tendenz der Druckentwicklung für jede Gruppe nach ca. vier Wochen sichtbar. Der Blutdruck für die Gruppe ohne Futterzusatz, wie auch für die, in deren Pellets die konventionelle Säuglingsnahrung KN3 eingearbeitet wurden, stieg im Verlauf der Studie weiter an. Dagegen blieben die Werte der Nager, denen durch ihr Futter HA-Nahrung bzw. Captopril appliziert

wurde, dauerhaft niedriger als zu Beginn der Studie. Zur Veranschaulichung der signifikanten Unterschiede in der Blutdruckentwicklung und Standardabweichungen der verschiedenen Futtergruppen wurde die nachfolgende Abbildung gewählt, die die gemittelte systolische Blutdruckänderung jeder Gruppe nach siebenwöchiger Applikation des entsprechenden Zusatzes an HA3, KN3, Captopril bzw. kein Zusatz zeigt. Aus dieser Darstellung sind, wie auch schon in den einzelnen Versuchsreihen diskutiert, die signifikanten Unterschiede für die verschieden eingeteilten Gruppen sichtbar. In der Captopril-Gruppe lagen die stärksten hypotensiven Effekte vor. Nach der siebenwöchigen Aufnahme des Medikamentes konnte im Vergleich mit allen anderen Gruppen eine signifikante Druckänderung von - 26 mm Hg ermittelt werden. Auch die Nager, die HA3 als Zusatz zu sich nahmen, zeigten signifikante Unterschiede zu allen anderen Gruppen und eine mittlere Absenkung von -10 mm Hg. Die Placebo-Gruppe, wie auch die Gruppe mit KN3 als Zusatz, zeigten keine signifikanten Unterschiede. Die Placebo-Gruppe zeigte kaum eine Änderung des Blutdruckes nach sieben Wochen. Dagegen konnte für die Nager, deren Futter die konventionelle Säuglingsnahrung enthielt, zu diesem Zeitpunkt ein Blutdruckanstieg von 7 mm Hg bestimmt werden (nicht signifikant).

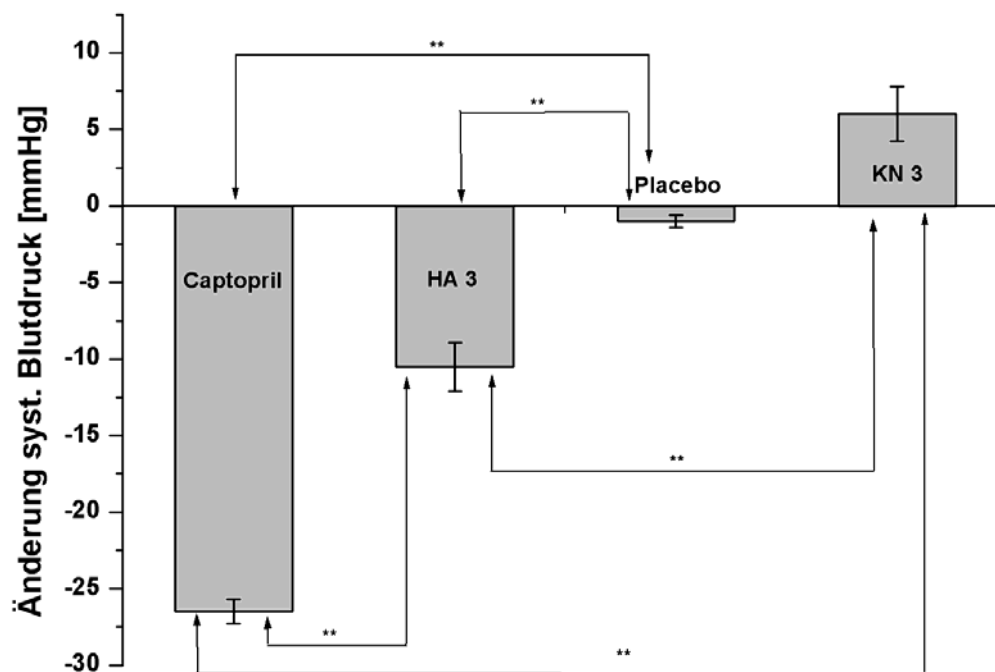


Abbildung 4.9.3-2: Entwicklung des systolischen Blutdruckesunterschiedes bezogen auf den Ursprungswert der einzelnen Futterzusatz-Gruppen nach 7 Wochen Applikation (mit ** $p < 0,05$)

Unter Einbezug aller Daten vom Start der Fütterungsstudie bis nach 15wöchiger Applikation konnte eine durchschnittliche Blutdruckabsenkung durch Captopril bzw. der HA-Nahrung von -28 mm Hg bzw. -17 mm Hg erreicht werden. Der Blutdruckabfall für die Aufnahme durch die HA-Nahrung, die in etwa der Menge entspricht, die ein Säugling auch zu sich nehmen würde, ist zwar nicht so stark wie die des Pharmazeutikums, aber dennoch sehr deutlich. Besonders wenn bedacht wird, dass die Aufnahmemenge an HA-Nahrung in etwa der eines Säuglings entspricht, Captopril dagegen in wesentlich höheren Dosen als zur Behandlung von Hypertonie (max. 150 mg pro Tag) eingesetzt wurde. Bekannte Studien in denen ebenfalls der Effekt von Captopril an SHR getestet wurde, zeigten ähnliche Effekte. So beschreiben *Wu et al. (2002)* beispielsweise bei einer täglichen Aufnahme von 50 mg/kg Körpergewicht eine Drucksenkung von -36 mm Hg nach drei Wochen Applikation. Dies entspricht in etwa einer Verteilung im Blutvolumen von 0,6 g/l. Die Nager in der oben diskutierten Studie nahmen bezogen auf das Blutvolumen täglich ca. 0,9 g/l Captopril auf. Der IC_{50} -Wert des Arzneimittels wurde im vorhergehenden Kapitel für humanes ACE an HUVECs zu 2,6 μ g/l bestimmt. Für die Therapie von Hypertonikern werden tägliche Aufnahmemengen von 100 - 150 mg Captopril empfohlen, dass würde bezogen auf das Blutvolumen für die durchschnittlichen Werte eines Mannes mit einem Körpergewicht von 80 kg einer Aufnahme von 15 mg/l - 23 mg/l entsprechen. Damit liegen die Aufnahmemengen für die Nager, aber auch für die Patienten deutlich über der Konzentration, die für eine 50%ige ACE-Hemmung *in vitro* nötig ist, wobei die für die Nager 10^6 mal so hoch liegt. Wird die blutdrucksenkende Wirkung der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Aufnahme der hypoallergenischen Säuglingsnahrung bzw. dem Peptid IW mit denen, die für die Tripeptide VPP und IPP bzw. den fermentierten Milchprodukten in denen sie enthalten sind, verglichen, so wird eine ähnliche Absenkung erreicht. *Nakamura et al. (1995a)* untersuchten beispielsweise das Sauermilchgetränk Calpis auf Effekte in SHR. Dabei wurde den Ratten täglich ca. 21 mg/kg KG VPP bzw. 16 mg/kg KG IPP durch das Sauermilchgetränk Calpis verabreicht. Dies entspricht bezogen auf das Blutvolumen 263 mg/l VPP bzw. 200 mg/l IPP, damit in etwa der 100fachen Menge des IC_{50} -Wertes der beiden Tripeptide (IC_{50} IPP = 1,6 mg/l bzw. VPP = 2,8 mg/l). Im Gegensatz dazu nahmen die hier untersuchten Nager ca. 1,56 mg/kg KG des Dipeptids IW täglich zu sich. Bezogen auf das Blutvolumen wurde mit 19 mg/l, ebenfalls fast 100mal mehr als der IC_{50} -Wert von 0,22 mg/l aufgenommen. In beiden Studien wurden nahezu identische Blutdruckabsenkungen erreicht. *Nakamura et al.* zeigten eine Absenkung von -18 mm Hg nach acht Wochen täglicher Aufnahme, in der hier diskutierten Studie wurde der Druck im Durchschnitt um -17 mm Hg abgesenkt. Untersuchungen am Menschen ergaben ähnlich Drucksenkungen. So zeigten *Hata et al.*

(1996) dass nach acht Wochen täglicher Aufnahme von 95 ml Calpis, was 2 mg/kg KG bzw. 0,033 mg VPP und 0,025 mg IPP entspricht, eine Senkung des systolischen Blutdruckes um - 14 mm Hg erreicht werden konnte. Bezogen auf das Blutvolumen der jeweiligen Probanden und unter Annahme einer vollständigen Resorption der Peptide nahmen die Studienteilnehmer bei *Hata et al.* 0,42 mg/l VPP bzw. 0,3 mg/l IPP auf und in den Untersuchungen von *Nakamura et al.* sogar 263 mg/l VPP und 200 mg/l IPP. Dennoch liegen die Drucksenkungen im ähnlichen Bereich, obwohl der IC_{50} -Wert der Peptide mit 2,8 mg VPP/l und 1,6 mg IPP/l in der Humanstudie etwas unterschritten und in der Tierstudie erheblich überschritten wird. Dies könnte damit erklärbar sein, dass die Stoffwechselvorgänge in der Ratte gegenüber denen des Menschen stark erhöht sind, damit kann auch angenommen werden, dass die Peptide wie auch andere Stoffe wesentlich schneller verstoffwechselt und damit abgebaut werden. Dies würde bedeuten, dass es sehr wahrscheinlich ist, dass auch geringere Aufnahmemengen des in der hier durchgeführten Fütterungsstudie genutzten Milchpulvers (hypoallergen S Säuglingsnahrung HA3), zu einer blutdrucksenkenden Wirkung bei hypertensiven Patienten führen können. Um die Relevanz dieser Studie zu verdeutlichen, sind in Tabelle 4.9.3-1 die Einstufungen der Blutdruckwerte der WHO (World Health Organisation) und der ISA (International Society of Hypertension) dargestellt.

Tabelle 4.9.3-1: Einteilung der Blutdruckbereiche laut WHO und ISA

	Systolischer Blutdruck [mm Hg]	Diastolischer Blutdruck [mm Hg]
Optimaler Bereich	< 120	< 80
Normaler Bereich	< 130	< 85
Hoch-normaler Bereich	130 - 139	85 - 89
Milde Hypertonie (Schweregrad 1)	140 - 159	90 - 99
Mittler Hypertonie (Schweregrad 2)	160 - 179	100 - 109
Schwere Hypertonie (Schweregrad 3)	≥ 180	≥ 110

Die einzelnen Bereiche unterscheiden sich jeweils nur um 10 mm Hg. Das heißt, dass im Falle einer identischen Absenkung des Blutdrucks beim Menschen, wie sie in der Fütterungsstudie an den SHR für die Aufnahme der HA-Nahrung gezeigt werden konnte, beispielsweise eine schwere Hypertonie (Schweregrad 3) in eine Mittlere Hypertonie verändert werden oder ein Blutdruck im hoch-normalen Bereich in den Normalbereich verschoben wird. Dies würde

eine sehr deutliche Milderung des Symptoms Bluthochdruck bei Patienten bedeutet. Damit stellt sich die Frage, ob durch eine zusätzliche Aufnahme des HA-Produktes neben den üblichen Medikamenten gegen Bluthochdruck die Medikamentendosis verringert werden könnte. Diese Frage ist für zukünftige Präventionsstrategien von Bedeutung, da in Deutschland fast 20% der Bevölkerung bzw. jeder zweite über 50 Jahre unter einem behandlungsbedürftigen Bluthochdruck leiden. Supportive diätetische Maßnahmen könnten die Ausgaben für antihypertensive Medikamente günstig beeinflussen und den Zeitpunkt der Behandlungsnotwendigkeit mit diesen Medikamenten verzögern. Ein weiterer interessanter Aspekt dabei könnte eine eventuelle Verringerung von Nebenwirkungen, die man bei der konventionellen Behandlung mit Pharmazeutika in Kauf nimmt, sein. Für stichhaltige Aussagen müssten allerdings klinische Untersuchungen durchgeführt werden, da nicht davon ausgegangen werden kann, dass ein „natürliches“ Produkt vollkommen frei von Nebenwirkungen ist. Eine Studie von *Matsui et al. (2006)* zeigte ebenfalls einen nicht zu vernachlässigenden Gesichtspunkt, der bei einer kombinierten Medikation von synthetischen mit Peptid-ACE-Hemmern nicht außer Acht gelassen werden darf. Sie konnten zeigen, dass bei gleichzeitiger Aufnahme von Captopril und dem Peptid-Inhibitor VY sowohl die Konzentration des Arzneimittels im Plasma verringert wird wie auch der hypotensive Effekt. Dies legt nahe, dass bei zeitgleicher Applikation des Peptid-Inhibitors und des Captoprils die Resorptionsreserven für die Peptid/Peptidanalogen erreicht werden und nachfolgend eine verminderte Captopril-Resorption resultiert. Daher wird dazu geraten, pharmazeutische ACE-Hemmer nicht zeitgleich mit Peptid-haltigen Lebensmitteln aufzunehmen, sondern zeitlich versetzt. Inwieweit die Resorption von Captopril bzw. anderer synthetischer ACE-Hemmer auch durch die in der HA-Nahrung enthaltenen Peptide beeinflusst wird, müsste ebenfalls in weiteren Studien geklärt werden. Interessant wäre eine mögliche hypotensive Wirkung auch bei Blutdruckwerten im Hoch-normalen- bzw. leichten Hypertonie-Bereich, da hier der ständig erhöhte Druck schon mit Schäden in den Blutgefäßen assoziiert ist. Durch die Aufnahme der HA-Nahrungen bzw. einem Produkt, in dem hemmende Peptide enthalten sind, könnte auf eine Medikamentengabe in diesem Stadium verzichtet werden und der Zeitpunkt des Auftretens eines behandlungspflichtigen Bluthochdrucks verzögert werden. Besonders für die Prophylaxe erscheint daher eine Aufnahme solcher funktionellen Lebensmittel reizvoll. Wichtig ist in diesem Zusammenhang auch, dass derartige peptidhaltige Nahrungsmittel prophylaktisch auch ohne die Stellung einer Bluthochdruckdiagnose zugeführt werden können. Hiermit werden bevölkerungsweite Vorbeugestrategien möglich.

HA-Nahrung wird in erheblichem Umfang im Säuglingsalter verabreicht. Vor dem Hintergrund der hier dokumentierten ACE-hemmenden Aktivität ist es von Interesse, in

welcher Weise die Langzeitaufnahme der HA-Nahrung physiologische Vorgänge im Säuglingsalter beeinflusst. Eventuell ist dann das Produkt im Hinblick auf die Säuglingsernährung neu einzustufen. Hierbei ist zu beachten, dass Säuglinge im Allgemeinen eine höhere ACE-Aktivität als Erwachsene aufweisen, obwohl der Blutdruck eines Neugeborenen bzw. Säuglings mit durchschnittlich 70/50 bzw. 90/65 mm Hg deutlich niedriger liegt. *Forsyth et al. (2004)* ermittelten beispielsweise ACE-Aktivitäten im Serum von Neugeborenen von 56 units/l und nach einen bzw. drei Lebensmonaten sogar Werte um 76 units/l, während die Serum-ACE-Aktivität der Mütter Werte von 30 units/l zeigten und der Wert sich auch nach drei Monaten nicht veränderte. Die höheren ACE-Aktivitäten begründen sie damit, dass besonders die Endothelzellen der Lunge viel ACE aufweisen und die Entwicklung der Lungen besonders in den letzten Monaten der Schwangerschaft, sowie kurz nach der Geburt rasch abläuft. Weitere Studien zeigten, dass die ACE-Aktivität in Frühgeborenen mit noch unreifen Lungen ebenfalls erhöht ist (*Walter et al., 2002*). Dies lässt darauf schließen, dass die Aktivität des Enzyms möglicherweise eine Rolle bei der Entwicklung des Organs spielt. Es besteht daher Klärungsbedarf, inwieweit sich ACE-hemmende Verbindungen, die durch hypoallergene Säuglingsnahrung aufgenommen werden, auf diese Entwicklung auswirken. Wie schon oben gezeigt, bedeutet eine hohe ACE-Aktivität nicht zwangsläufig, dass das RAAS hochaktiv ist und daraus ein hoher Blutdruck resultieren würde. Fraglich ist, inwieweit weitere Parameter wie beispielsweise die Renin-Sekretion, die Expression von Angiotensinrezeptoren oder auch die Aldosteronregulation durch die Hemmung des ACE bzw. durch eine hohe ACE-Aktivität beeinflusst werden. Interessant erscheint ebenfalls die Überlegung, ob es durch die Hemmung von ACE im Säuglingsalter zu einer Reduktion von kardiovaskulären Erkrankungen im Erwachsenenalter kommen könnte, wie von anderen Autoren diskutiert (*Forsyth et al., 2004; Martin et al., 2005*).

4.10 Schlussfolgerungen

Hypoallergene Säuglingsnahrungen zeichnen sich dadurch aus, dass zur Verminderung der Allergenität des Produktes hydrolysiertes Molkenprotein als Eiweißquelle eingesetzt wird. In konventionellen Nahrungen liegen dagegen die Milchproteine noch intakt vor. Die Untersuchungen zeigten, dass dies auch der Grund ist, warum die konventionellen Produkte im Gegensatz zu den HA-Nahrungen keine *in vitro* ACE-inhibierende Wirkung zeigten. Das hemmende Potential zeigte deutlich Unterschiede zwischen den Produkten, allerdings konnte kein Zusammenhang zwischen diesem und dem jeweiligen Hydrolysegrad gezogen werden. Dies wurde in späteren Untersuchungen bestätigt, in denen ein Molkenproteinpulver

anlehnend an ein Patent mit unterschiedlichen Parametern untersucht wurde und auf den ACE-hemmenden Effekt hin untersucht, sowie der Hydrolysegrad ermittelt wurde. Auch hier konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Grad der Proteinverdauung und der ACE-Inhibierung getroffen werden. Daher müssen Verbindungen in geringer Konzentration vorliegen, die eine starke Hemmung verursachen. Untersuchungen zur Identifizierung dieser Substanzen ergaben schließlich ACE-inhibierende Peptide, die einen Anteil der Gesamthemmung des Produktes erklären können. Für vier Dipeptide konnten die Gehalte in den Nahrungen eindeutig quantifiziert werden. Es handelte sich dabei um VY, GY, WL und IW, wobei das als letztes genannte von großer Bedeutung ist, da es bisher noch nicht in Milchprodukten als ACE-Inhibitor identifiziert wurde. IW war bisher nur als Bestandteil von Hydrolysaten der Wakame (*Undaria pinnatifida*), einer Algenart, bekannt (Sato *et al.*, 2003). Des Weiteren handelt es sich bei diesem Dipeptid um einen extrem potenten Inhibitor, für den ein IC₅₀-Wert von 0,7 µM bestimmt wurde, der bislang niedrigste IC₅₀-Wert, der für einen Lebensmittelinhaltsstoff ermittelt werden konnte. Für die schon erwähnten Tripeptide IPP und VPP, die in fermentierten Milchprodukten enthalten sind und hypotensive Effekte bei Hypertonikern zeigten, sind dagegen etwa zehnmal höhere Konzentrationen nötig, um das gleiche Hemmpotential wie IW zu erreichen. Obwohl mit den quantifizierten Gehalten nicht das komplette Hemmpotential der HA-Nahrungen erklärt werden kann, liegt das Dipeptid in solchen Konzentrationen vor (100 - 860 µg/g Protein), dass mögliche physiologische Konsequenzen, wie ein hypotensiver Effekt, nicht ausgeschlossen werden können. Um jedoch Auswirkungen in lebenden Organismus zeigen zu können, müssen die Peptid-Inhibitoren stabil gegen Proteasen des Gastrointestinaltraktes sein, resorbiert werden und zu dem ACE, welches an der luminalen Oberfläche der Endothelzellen lokalisiert ist, gelangen. Des Weiteren ist es von Interesse, inwieweit der hemmende Effekt der hypoallergen Sänglingsnahrungen durch die Lagerung des Lebensmittels beeinflusst wird. Die Resorption der Peptid-Inhibitoren kann minimiert werden, wenn diese durch die Maillard-Reaktion mit Lactose derivatisiert wurden. Die Studien zu diesen Aspekten zeigten jedoch, dass auch nach Inkubationen über 48 h bei einer Reaktionstemperatur von 80°C, das Peptid IW kaum in seinem hemmenden Effekt beeinflusst wird, da es offensichtlich relativ reaktionsträge ist. Das Gesamt-Inhibierungspotential der HA-Nahrungen veränderte sich minimal im Laufe der Inkubationszeit, da nicht allein IW für den hemmenden Effekt verantwortlich ist. Es kann davon ausgegangen werden, dass eine normale Lagerung, selbst über Raumtemperatur, bis zum Verzehr keinen Einfluss auf das Inhibierungspotential der HA-Nahrungen zeigt, besonders, wenn beachtet wird, dass eine Verschlechterung der Hemmwirkung mit einer Braunfärbung des Milchpulvers einherging und diese optische Veränderung dazu beiträgt,

dass das Lebensmittel nicht mehr verzehrt wird. Die Vorgänge im Gastrointestinaltrakt wurden durch die entsprechenden Parameter (Enzyme, pH-Wert, Temperatur, Verweildauer, usw.) nachempfunden. Zwar konnte in diesen Studien gezeigt werden, dass durch die Verdauungsabläufe auch aus intaktem Protein, wie es in den konventionellen Säuglingsnahrungen bzw. auch in der Humanmilch vorliegt, ACE-inhibierende Peptide freigesetzt werden, doch konnte nicht annähernd der hemmende Effekt der HA-Nahrungen erreicht werden. Dieser wurde auch nicht durch die simulierte gastrointestinale Verdauung beeinflusst. Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass die meisten ACE-inhibierenden Peptide proteolysestabil gegenüber den Verdauungsenzymen sind, bzw. im gleichen Maße neue Hemmstoffe gebildet, wie andere abgebaut werden. Einzelversuche mit dem Standardpeptid IW zeigten, dass dies die simulierte gastrointestinale Verdauung übersteht und damit eine Grundvoraussetzung für einen möglichen hypotensiven Effekt aufweist. Dies bestätigt Untersuchungen von *Sato et al. (2003)*, die zeigten, dass neben anderen Peptiden IW nicht während der von ihnen durchgeführten *in vitro* Proteolyse des Gastrointestinal-Trakts abgebaut wird. Weitere Studien an humanen Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVECs) sollten zum einen belegen, dass auch das humane ACE durch die Peptid-Inhibitoren sowie den HA-Nahrungen gehemmt wird, da in den *in vitro* Studien nur ACE aus der Kaninchenlunge verwendet wurde. Zum anderen sollte damit sichergestellt werden, dass die Hemmstoffe nicht durch weitere in den Zellen vorliegende Proteasen abgebaut werden und so keine hypotensiven Effekte auf Grund der ACE-Inhibierung zeigen könnten. Auch in diesen Studien konnten die vorher aufgestellten Hypothesen belegt werden. Zwar zeigte die HA-Nahrung, wie auch das Einzelpeptid IW, eine minimal schlechtere Hemmwirkung als es in den *in vitro* Untersuchungen der Fall war, aber dennoch so stark, dass zur endgültigen Abklärung hypotensiver Effekte, hervorgerufen durch die Aufnahme der HA-Nahrungen, Fütterungsstudien am Tier durchgeführt wurden. Die wichtigste Schlussfolgerung dieser Studie war, dass die Aufnahme von hypoallergener Säuglingsnahrung bei spontan hypertensiven Ratten (SHR) durchschnittlich zu einer enormen Absenkung des Blutdruckes (-17 mm Hg) führt (Captopril -28 mm Hg). Das bedeutet, dass die Peptide, die in diesem Lebensmittel vorliegen auch *in vivo* einen starken ACE-hemmenden Effekt und damit starke hypotensive Wirkung zeigten. Dies ist besonders im Hinblick auf die Entwicklung gesundheitsorientierter Lebensmittel interessant. Es wird geschätzt, dass über 20% der deutschen Bevölkerung, bzw. jeder zweite im Alter über 55 Jahre Arzneimittel gegen Hypertonie verordnet bekommt. Da ein erhöhter Blutdruck allerdings zunächst nahezu keine subjektiven Symptome aufweist, erfolgt die Diagnose meist zufällig oder wird erst relativ spät erfasst. Häufig sind zu diesem Zeitpunkt pathophysiologische Veränderungen fortgeschritten und das Risiko, an

kardiovaskulären Erkrankungen zu leiden, ist stark erhöht. Im Vergleich zu Menschen, die einen als optimal angesehenen systolischen Blutdruck von 110 mm Hg aufweisen, ist das Risiko für Hypertoniker mit einem Druck von 145 mm Hg an koronaren Herzkrankheiten zu versterben, verdoppelt bzw. sogar verdreifacht, wenn Werte von 160 mm Hg erreicht werden. Wie schon erwähnt werden meistens zur Therapie von Hypertonie ACE-Hemmer eingesetzt, die ebenso wie die Peptid-Inhibitoren im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System das ACE inhibieren. Dabei fallen für das Gesundheitssystem enorme Kosten an (ca. 0,75 Milliarden Euro im Jahr 2005 [Schwabe und Pfaffrath, 2006]), die durch die kombinierte Aufnahme von ACE-Inhibitoren aus der Nahrung verringert werden könnten. Entsprechende Lebensmittel sind inzwischen auf den europäischen Markt (Finnland, Spanien, Schweiz) bzw. auch in Japan zu finden. Diese fermentierten Milchprodukte beinhalten die oben genannten Peptide IPP und VPP, denen die hypotensive Wirkung auf Grund ihrer ACE-Hemmung zugeschrieben wird. Da das hier untersuchte Milchprodukt einen stärkeren Inhibierungseffekt hervorruft und auch das IW ein stärkeres Hemmpotential zeigt, ist anzunehmen, dass eine kombinierte Aufnahme dieses Peptides bzw. der Produkte, in denen es enthalten ist, mit pharmazeutischen ACE-Hemmern eine unterstützende Therapiemaßnahme für Hypertoniker darstellt. Bei dieser Empfehlung ist jedoch darauf zu achten, dass im Vorfeld untersucht wird, wie sich die Aufnahme der beiden Hemmer auf die Resorption des Arzneimittels auswirkt, da Matsui *et al.* (2006) zeigen konnten, dass Captopril vermindert im Plasma vorliegt, wenn gleichzeitig der Peptid-Inhibitor VY aufgenommen wurde. Dies lässt sich allerdings umgehen, indem dazu geraten wird, das Arzneimittel nicht mit milchhaltigen und im Besonderen nicht mit den funktionellen Lebensmitteln aufzunehmen. Personen die an Diabetes mellitus Typ 2 erkrankt sind, leiden noch häufiger unter arterieller Hypertonie als Personen ohne Diabetes (Hanefeld *et al.*, 1991). Damit wird die Entstehung typischer Folgeerkrankungen der Diabetiker, wie z. B. Nierenschädigungen, stark beschleunigt. Ein Diabetiker mit erhöhten Blutdruckwerten weist im Vergleich mit einem Hypertoniepatienten, der nicht unter Diabetes mellitus leidet, ein vierfach höheres kardiovaskuläres Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko auf (*Hypertension in Diabetes Study*, 1993). Daher ist es besonders für diese Patientengruppe nötig, eine Absenkung des Blutdruckes zu erreichen. Meistens werden zu diesem Zweck ACE-Hemmer verabreicht, da sie den Verlauf einer diabetischen Nierenschädigung verlangsamen (Laffel *et al.*, 1995; Lewis *et al.* 1993). Daher wäre die Aufnahme der in dieser Arbeit diskutierten ACE-inhibierenden Peptide besonders für Diabetiker als Präventionsmaßnahme interessant, um mögliche Nierenschädigungen zu verhindern bzw. herauszuzögern.

Wie in dem Kapitel vorher schon diskutiert, muss ebenfalls eine neue Bewertung der hypoallergen Produkte hinsichtlich der Ernährung von Säuglingen erfolgen. Da an Hand

der in dieser Arbeit diskutierten Ergebnisse nicht davon ausgegangen werden kann, dass die kontinuierliche Aufnahme der hypotensiv wirkenden Peptide aus den HA-Produkten keinen Einfluss auf den gesunden Organismus des Säuglings hat. Eine mögliche hervorgerufene Wirkung muss nicht zwangsläufig negativ sein. Da oft eine geringere ACE-Aktivität auch mit einem geringen Risiko kardiovaskulärer Erkranken in Verbindung gebracht wird. Es besteht also auch die Möglichkeit einer protektiven Wirkung durch eine ACE-Hemmung *in vivo* nach Aufnahme der HA-Produkte. Für eindeutige Aussagen müssen auch in diesem Falle weitere klinische Studien folgen.

5. Ausblick

Während der im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführten Studien konnten weitere interessante Aspekte aufgenommen werden, die nicht diskutiert wurden bzw. nicht eindeutig aufgeklärt wurden. In diesem Kapitel soll ein kurzer Ausblick über erworbene erste Ergebnisse geliefert werden, deren Weiterverfolgung für nachfolgende Arbeiten anzustreben ist.

Zur eindeutigen Identifizierung des Dipeptids IW in der HA-Säuglingsnahrung HA3 wurde die Probe chromatographisch aufgetrennt. Dabei wurde nicht allein der Bereich, in dem IW eluiert, isoliert, sondern es wurden weitere Fraktionen gewonnen und diese ebenfalls hinsichtlich ihrer ACE-Inhibierung untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass jedes Isolat eine Hemmung verursachte, doch jedes Mal in unterschiedlicher Intensität. Wie auch Fraktion 9, in der der sehr potente ACE-Inhibitor IW vorliegt, wurden drei weitere stark hemmende Fraktionen (2, 4 und 6) ein weiteres Mal chromatographisch aufgetrennt. Zur besseren Veranschaulichung ist das gewählte Fraktionier-Schema der Probe 3 in Abbildung 5-1 dargestellt. Für alle erhaltenen Fraktionen wurden der Proteingehalt mittels Aminosäureanalyse sowie der IC_{50} -Wert (Tabelle 5-1) ermittelt.

Tabelle. 5-1: Proteingehalte und IC_{50} -Werte ausgewählter Unterfraktionen von Fraktion 2, 4, 6 und 9

Fraktion	2-1	2-2	2-3	2-4	2-5	2-6		2
Proteingehalt [g/100g]	0,2	10,0	1,4	1,5	6,0	0,6		3,1
IC_{50} [mg Protein/l]	-	185,4	32,9	37,8	19,8	3,3		4,2
Fraktion	4-1	4-2	4-3	4-4	4-5	4-6	4-7	4
Proteingehalt [g/100g]	0,5	6,3	3,5	1,2	30,6	10,2	0,1	9,2
IC_{50} [mg Protein/l]	7,4	102,6	26,4	3,2	50,5	262,5	-	7,2
Fraktion	6-1	6-2	6-3	6-4	6-5	6-6	6-7	6
Proteingehalt [g/100g]	4,0	20,1	13,6	1,8	26,0	6,6	7,2	42,3
IC_{50} [mg Protein/l]	24,9	25,1	6,1	1,7	14,1	30,2	40,2	8,5
Fraktion	9-2	9-3	9-4	9-5	9-6	9-7	9-9	9
Proteingehalt [g/100g]	25,2	10,7	34,1	14,9	12,2	6,7	12,7	44,6
IC_{50} [mg Protein/l]	31,4	4,8	57,2	14,0	6,6	30,5	21,6	2,5

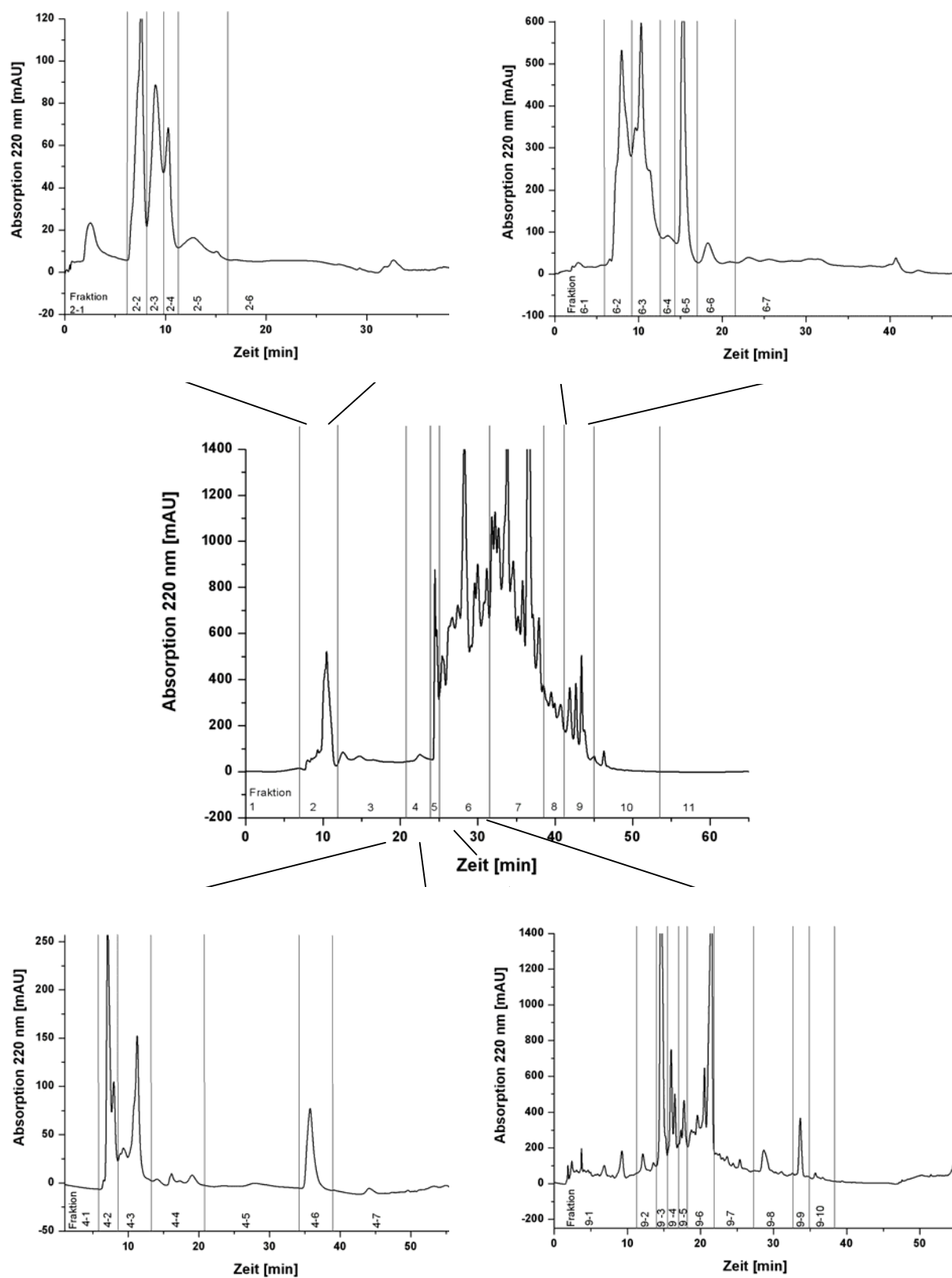


Abbildung 5-1: Darstellung des Fraktionierschemas der Probe 3 an Hand der semi-präparatives RP-HPLC-Chromatogramme bis hin zu den Unterfraktionen; Detektion $\lambda = 220$ nm

In der stark hemmenden Fraktion 9-3 wurde IW identifiziert. Ähnliche und zum Teil ein stärkeres Hemmvermögen zeigen andere Unterfraktionen wie 2-6 und 6-4. Gegenstand weiterer Arbeiten sollte daher die Identifizierung der Verbindungen sein, die diese starke ACE-Inhibierung verursachen.

Neben der hypoallergen Säuglingsnahrung HA3 sowie dem entsprechenden konventionellen Produkt KN3 (vgl. Kapitel 4.7) wurde auch eine Humanmilch dem simulierten gastrointestinalen Verdau unterzogen.

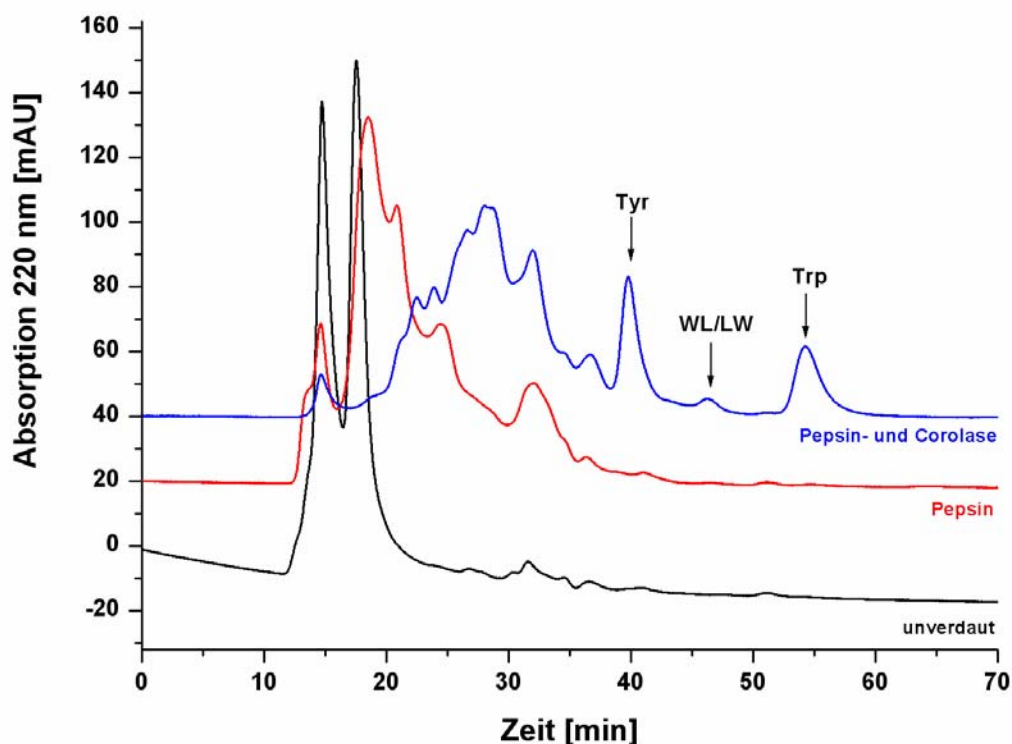


Abbildung 5-2: GPC-Chromatogramm der Humanmilch nach den unterschiedlichen Stufen der simulierten gastrointestinalen Verdauung

Die entrahmte Humanmilch zeigte unverdaut keinen ACE-inhibierenden Effekt, nach den unterschiedlichen Verdauustufen, konnte allerdings eine ACE-Inhibierung beobachtet werden. Da nur wenig Probenmaterial vorlag, konnte allerdings kein IC_{50} -Wert für die verdaute Probe ermittelt werden, so dass die Hemmwirkung nur mit einer Konzentration von 92 mg Protein/l im Ansatz bestimmt werden konnte. Dabei wurde eine 30%ige Inhibierung des ACE ermittelt, der IC_{50} -Wert liegt demnach über dem der hypoallergen Säuglingsnahrung HA3 (IC_{50} = 29 mg Protein/l), aber weit unter dem der konventionellen Nahrung KN3 mit IC_{50} = 1331 mg Protein/l. Zwei Kuhmilchproben (Frishmilch), die ebenfalls mit den Proteasen inkubiert

wurden, zeigten bei einem Proteineinsatz von 120 mg/l eine ACE-Inhibierung von 43-54%. Es werden also aus den Proteinen der Kuhmilch wie auch aus denen der Humanmilch ACE-inhibierende Peptide während dem proteolytischen Verdau freigesetzt. Da α -Lactalbumin die Hauptkomponente der Proteine in der Humanmilch darstellt, scheint es sehr wahrscheinlich, dass Fragmente aus diesem Protein die Hemmung verursachen. Dabei liegt besonderes Augenmerk auf WL, welches ebenfalls zweimal in der Sequenz des α -La zu finden ist. IW dagegen kommt nicht in diesem Molkenprotein vor. An dieser Position (α -La 59-60) im Protein wurde LW identifiziert (*Findley und Brew; 1972*). Dieses Peptid zeigt eine geringere Hemmwirkung als IW, es werden für ein 50%ige Inhibierung 8 μ M benötigt. Damit zählt es allerdings noch zu den potenten ACE-Hemmern und könnte, wenn es in ausreichender Konzentration freigesetzt wird, den relativ starken Hemmeffekt nach der simulierten gastrointestinalen Verdauung erklären. Eine weitere Quantifizierung des Peptids steht noch aus. Ebenso sind Studien hinsichtlich der Resorption des LW nach dem Verdau und damit einem möglichen hypotensiven Effekt von großem Interesse, da bisher noch keine Literaturangaben bezüglich ACE-inhibierender Peptide aus Humanmilch vorliegen.

6. Zusammenfassung

Synthetische Hemmstoffe des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE) werden seit langem zur Behandlung von Hypertonie eingesetzt. Aus der Literatur sind ebenfalls viele Inhibitoren natürlichen Ursprungs bekannt. Bei diesen Lebensmittelinhaltsstoffen handelt es sich meist um Peptide, die vor allem aus Milchproteinen gewonnen werden können. So gibt es inzwischen funktionelle Milchprodukte auf dem ausländischen Markt, die auf Grund der ACE-inhibierenden Peptide VPP und IPP mit blutdrucksenkender Wirkung ausgelobt werden. Da in hypoallergenen (HA) Säuglingsnahrungen eine Vielzahl an Milchpeptiden auf Grund vorheriger Hydrolyse vorliegen, sollten diese Produkte in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich ihres ACE-inhibierenden Effekts untersucht werden. Des Weiteren war es Ziel, ACE-hemmende Peptide aus den Säuglingsnahrungen zu identifizieren und zu quantifizieren, sowie anhand von Zellversuchen und Fütterungsstudien mit spontan hypertensiven Ratten einen möglichen hypotensiven Effekt *in vivo* zu ermitteln.

1. Für konventionell erhältliche hypoallergene Säuglingsnahrungen konnte im Gegensatz zu den konventionellen Produkten und Humanmilchproben eine starke Hemmung der ACE-Aktivität *in vitro* bestimmt werden. Dabei wurden für die HA1-Produkte, die ab der Geburt als vollwertige Kost eingesetzt werden können, durchschnittliche IC_{50} -Werte um 100 mg Protein/l (Spannweite von 20 - 428 mg Protein/l) bestimmt. Die entsprechenden hypoallergenen Säuglingsnahrungen, die für die Ernährung ab dem vierten Lebensmonat geeignet sind, zeigten einen geringeren Inhibierungseffekt (43 - 464 mg Protein/l). Die entsprechenden konventionellen Produkte und Humanmilchproben zeigten auch bei einem Proteineinsatz von 1144 mg/l keinen hemmenden Effekt.
2. Gelpermeationschromatographische Untersuchungen zeigten für alle Produkte, in denen enzymatisch verdaute Molkenproteine eingesetzt wurden, nur geringe Unterschiede im Hydrolysegrad. Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem Hydrolysegrad und dem Hemmpotential der Proben ermittelt werden.
3. Mittels LC-ESI-TOF-MS-Untersuchungen konnten am Beispiel einer ausgewählten HA-Probe (HA3) fünfzehn unterschiedlich stark ACE-hemmende Peptide eindeutig nachgewiesen werden. Von besonderer Bedeutung ist dabei das erstmals in Milchprodukten identifizierte, stark ACE-inhibierende Dipeptid IW ($IC_{50} = 0,7 \mu M$). Die eindeutige Identifizierung des Produktes erfolgte durch Bestimmung der molaren Masse, UV-Spektrum und Retentionszeit mittels LC-ESI-TOF-MS und Vergleich mit

- Standardpeptiden. Zusätzlich wurde der N-Terminus mittels Dansylchloridderivatisierung und anschließender Auftrennung durch RP-HPLC ermittelt.
4. Die Quantifizierung potenter ACE-inhibierender Peptide wurde für die vier Dipeptide GY, VY, IW und WL mittels RP-HPLC und UV-Detektion sowie für die tryptophanhaltigen Peptide zusätzlich mit Fluoreszenzdetektion durchgeführt. Dabei konnte GY (IC_{50} = 180 μ M) in den HA-Proben 3 und 4 zu 5,4 bzw. 27,9 mg/g Protein sowie VY (IC_{50} = 26 μ M) in Probe 1 und 2 mit 4,9 bzw. 4,7 mg/g Protein quantifiziert werden. In den anderen Proben war kein Nachweis der beiden Peptide möglich. WL (IC_{50} = 10 μ M) wurde in allen sieben HA-Proben identifiziert und ein Gehalt von 100 bis 750 μ g/g Protein bestimmt. Der sehr potente ACE-Inhibitor IW (IC_{50} = 0,7 μ M) wurde nur in Probe 7 nicht nachgewiesen, in den weiteren Säuglingsnahrungen konnten Gehalte von 130 - 860 μ g/g Protein ermittelt werden. Die Gehalte der vier Peptide am IC_{50} -Wert der entsprechenden HA-Proben reichen allerdings nicht aus, um den unterschiedlich stark hemmenden Effekt der HA-Proben bzw. die jeweilige Gesamtinhibierung der Einzelprobe zu erklären. Allerdings tragen sie maßgeblich zum Gesamtinhibierungspotential bei.
 5. Des Weiteren wurden die Parameter für die Bildung ACE-hemmender Peptide in Molkenproteinen während der technologischen Herstellung eines Hydrolysats untersucht, um die unterschiedliche Hemmwirkung der HA-Nahrungen zu erklären. Schon nach einer sehr kurzen Hydrolysezeit von wenigen Minuten wurde ein stark ACE-inhibierendes Potential bestimmt, welches bei weitergeführter Hydrolyse mit den Proteasen Trypsin, Alcalase® und Flavourzyme® zu- bzw. wieder abnahm. Es wurden IC_{50} -Werte zwischen 180 und 36 mg Protein/l ermittelt, was in etwa dem Inhibierungspotential der HA-Nahrungen entspricht. Neben anderen konnte auch die Freisetzung der Peptid-Inhibitoren WL und IW während der Hydrolyse beobachtet werden. Auch bei diesen Studien konnte kein Zusammenhang zwischen dem Hydrolysegrad des Proteins und dem hemmenden Effekt nachgewiesen werden.
 6. Weitere Untersuchungen befassten sich mit Einfluss der Probenlagerung und dabei ablaufenden Glykierungsreaktionen auf den inhibierenden Effekt der HA-Nahrungen. Eine Lagerung der Proben über 14 Monate bei 37°C, 4°C bzw. Raumtemperatur zeigte keine Änderung im Inhibierungspotential. Daher wurde eine Stresslagerung der HA-Probe 3 bei 80°C über einen Zeitraum von 48 Stunden durchgeführt. Das Ausmaß der frühen Maillard-Reaktion wurde dabei über den Gehalt der Furoylderivate der Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin, die nach Säurehydrolyse mittels RP-HPLC bestimmt wurden, definiert. Nachdem dieser über acht Stunden Inkubation bis zu einem

Maximum anstieg, überwogen nachfolgend die Weiterreaktionen der Amadori-Produkte, so dass im weiteren Ablauf geringere Konzentrationen der Furoyllderivate bestimmt wurden. Der ACE-hemmende Effekt nahm mit laufender Inkubation bei 80°C ab und stieg zwischen 12 und 48 Stunden erneut leicht an. Das hemmende Potential, welches in der unbehandelten Probe vorlag, wurde nicht wieder erreicht.

7. Inkubationen mit Lactose und ausgewählten Peptiden (GY, VY, WL, IW, LW, LGG, LG, YV und FV) bei 80°C für fünf bzw. acht Stunden ergaben, dass sich der ACE-hemmende Effekt der in den HA-Nahrungen quantifizierten Peptidinhibitoren IW, VY, und GY nicht veränderte, während LGG, LG und auch WL durch die Inkubation an Inhibierungsvermögen einbüßten. Dagegen zeigte sich für das Dipeptid FV eine leichte Erhöhung des ACE-inhibierenden Potentials.
8. Für eine hypoallergene Säuglingsnahrung (HA3) und der entsprechenden konventionellen Nahrung (KN3) wurden die Auswirkungen der Verdauungsvorgänge im Gastrointestinal-Trakt auf die ACE-Hemmung analysiert. Für KN3 konnte ein IC_{50} -Wert von 1331 mg Protein/l nach simulierter Verdauung ermittelt werden. Neben anderen wurde auch das Dipeptide WL freigesetzt, welches u. a. diese Hemmung verursachte. IW wurde dagegen nicht in der verdauten Probe von KN3 bestimmt. Das Inhibierungspotential von KN3 nach simulierter Verdauung ist im Vergleich mit der HA-Nahrung (IC_{50} = 30 mg Protein/l) schlecht. Die Einwirkung der Proteasen zeigte auf die Hemmwirkung der HA-Nahrung keinen Einfluss.
9. Zur Klärung einer Proteolysestabilität der tryptophanhaltigen Dipeptide wurde mit den Einzelpeptiden IW, LW bzw. WL ebenfalls die simulierte gastrointestinale Proteolyse durchgeführt. Während LW und WL nur leicht (14 bzw. 12 %) durch die Proteasen abgebaut wurden, hatten diese keinerlei Effekt auf IW.
10. Durchgeführte ACE-Aktivitätsbestimmungen an humanen Endothelzellen (HUVECs), lieferten erste Hinweise auf einen möglichen hypotensiven Effekt, ausgelöst durch die Aufnahme von HA-Nahrungen. Dafür wurde zunächst ein Testsystem zur Bestimmung der ACE-Aktivität an HUVECs etabliert. Anschließend wurde der hemmende Effekt verschiedener Peptide, u. a. IW, sowie einer HA-Nahrung (Probe 3) auf das humane ACE untersucht. Die Hemmwirkung von IW wurde in dem *ex vivo*-Versuch geringer bestimmt (IC_{50} = 4,5 μ M) als *in vitro*, obwohl ebenfalls gezeigt werden konnte, dass das Dipeptid stabil gegen Proteasen des Zellsystems ist. Auch die HA-Nahrung zeigte eine etwas geringere Hemmung, allerdings besteht hier die Möglichkeit eines Abbaus bestimmter

Peptid-Inhibitoren durch Proteasen aus dem Zellsystem. Dennoch inhibierte auch diese Probe noch sehr stark mit einem IC_{50} -Wert von 63 mg Protein/l.

11. Für eine Fütterungsstudie an spontan hypertensiven Ratten (SHR) wurden insgesamt 48 Ratten in je vier Gruppen eingeteilt, denen jeweils unterschiedliche Zusätze über das Futter verabreicht wurden. Dabei handelte es sich zum einen um den ACE-Hemmer Captopril als Positivkontrolle, eine HA-Nahrung, eine konventionelle Säuglingsnahrung sowie eine Negativkontrolle ohne Zusatz zum Futter. Die Tiere nahmen während der Studie täglich 70 mg Captopril/kg Körpergewicht, 20 g HA-Nahrung (2,4 g Protein)/kg Körpergewicht bzw. 21 g konventionelle Säuglingsnahrung (2,4 g Protein) auf. Diese Mengen an Säuglingsnahrung entsprechen den täglichen Rationen eines Säuglings. Über 15 Wochen wurden die Blutdruckentwicklung der Nager nichtinvasiv mittels tail-cuff Methode bestimmt. Die systolischen Blutdruckwerte der SHR, die das konventionelle Produkt bzw. keinen Zusatz aufnahmen, waren annähernd gleich, während für die Tiere, die Captopril bzw. die HA-Nahrung aufnahmen eine signifikante Absenkung des Blutdrucks erreicht wurde. Dabei zeigte die Captopril-Gruppe eine durchschnittliche Absenkung um - 28 mm Hg und die HA-Gruppe - 17 mm Hg.

7. Literaturverzeichnis

- Alting, A. C., Meijer, R. J. G. M., Van Beresteijn, E. C. H.: Incomplete elimination of the ABBOS epitope of bovine serum albumin under simulated gastrointestinal conditions of infants, *Diabetes Care*, **1997**, *20*, 875-880
- Atkins, P. W.: Kurzlehrbuch Physikalische Chemie, dritte Auflage, 2001, WILEY-VCH Verlag GmbH Weinheim
- Auterhoff, H., Knabe, J., Hölzje, H.-D.: Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie, 14. neu bearbeitete Auflage, **1999**, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart
- Bachmann, H.-P., Bütikofer, U., Sieber, R.: Über das Vorkommen von bioaktiven Peptiden in Käse, *Eidgenössische Forschungsanstalt für Milchwirtschaft (FAM)*, **2003**, *45*, 1-18
- Bauer, C. P., von Berg, A., Niggemann, B., Rebien, W.: Primäre alimentäre Atopieprävention, *Allergo J.*, **2004**, *13*, 120-125
- Beck'sche Textausgaben: RL 91/321/EWG der Kommission vom 14.Mai 1991 über Säuglingsanfangsnahrung und Folgenahrung, Lebensmittelrecht Band 1, Textsammlung, C. H. Beck'sche Verlagsbuchhandlung, München
- Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P.: Lehrbuch der Lebensmittelchemie, 5. vollständig überarbeitete Auflage, **2001**, Springer Verlag Berlin Heidelberg
- Berg, V. A., Berdel, D.: Hypoallergene Säuglingsnahrung zur Allergieprävention, Anwendung bei Kindern mit Allergierisiko. *Monatsschr. Kinderheilkunde*, **2006**, *154*, 417-423
- Bertling, L.: Lebensmittelrechts – Handbuch, Losebl.-Ausg., 24. Ergänzungslieferung September **2005**, Verlag C. H. Beck München
- Bertrand-Harb, C.: Thermal modification of structure and co-denaturation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin induce changes of solubility and susceptibility to proteases, *Nahrung*, **2006**, *46*, 283-289
- Biesalski, H. K., Grimm, P.: Taschenatlas der Ernährung, 3., erweiterte und aktualisierte Auflage, **2002**, Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York
- Bindels, J. G., van Baalen, A., Hageman, R. J. J., et al.: Improved infant formula, protein hydrolysate for use in such an infant formula, and method for producing such a hydrolysate, *European Patent Application*, **2000**, EP 1 062 873 A1
- Böhles, H.: Ausblicke in eine zukünftige Säuglingsernährung, *Monatsschr. Kinderheilkunde*, **2003**, *1*, 89-96

- Brown, N. J., Vaughan, D. E.: Angiotensin-converting enzyme inhibitors, *Circulation*, **1998**, 97, 1411-1420
- Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung (BZgA): Stillen und Muttermilchernährung: Grundlagen, Erfahrungen und Empfehlungen, 5.vollständig überarbeitete Auflage, **2001**, Warlich, Meckenheim
- Bünning, P., Riordan, J. F.: Activation of angiotensin converting enzyme by monovalent anions, *Biochemistry*, **1983**, 22, 110-116
- Businco, L., Cantani, A., Longhi, M. A., et al.: Anaphylactic reactions to a cow's milk whey protein hydrolysate (Alfa-Fe, Nestle) in infants with cow's milk allergy, *Ann. Allergy*, **1991**, 52, 438-63
- Cheftel, J. C., Cuq, J. L., Lorient, D.: Lebensmittelproteine – Biochemie, Funktionelle Eigenschaften, Ernährungsphysiologie, Chemische Modifizierung, Behr's Verlag, 1. Auflage. **1992**
- Cheung, H.-S., Wang, F.-L., Ondetti, M. A., Sabo, E. F.; Cushman, D. W.: Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence, *J. Biol. Chem.*, **1980**, 255, 401-407
- Copeland, R. A.: Enzymes- a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis, **1996**, Wiley-VCH
- Cushman, D. W., Cheung, H.-S.: Spectrophotometric assay and properties of angiotensin-converting enzyme of rabbit lung, *Biochem. Pharmacol.*, **1971**, 20, 1637-1648
- Da Costa, E., Da Rocha Gondijo, J. A., Netto, F. M.: Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates, *Int. Dairy J.*, **2007**, 17, 632-640
- Das M., Soffer, R. L.: Pulmonary angiotensin-converting enzyme. Structural and analytical properties, *J. Biol. Chem.*, **1975**, 250, 6762-6768
- De Kok, P. M., Rosing, E. A. E.: Reactivity of peptides in the Maillard reaction, *ACS Symposium Series*, **1994**, 543, 158-79
- Dickhout, J. G., Lee, R. M.: Blood pressure and heart rate development in young spontaneously hypertensive rats, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **1998**, 274, 794-800.
- DIN 19738:2004-07 „Bodenbeschaffenheit-Resorptionsverfügbarkeit von organischen und anorganischen Schadstoffen aus kontaminiertem Bodenmaterial“

- Dominiczak, A. F., Bohr D. F.: Nitric oxide and its putative role in hypertension, *Hypertension*, **1995**, 25, 1202-1211
- Doucet, D., Otter, D. E., Gauthier, S. F., Foegeding, E. A.: Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by Alcalase: peptide identification and determination of enzyme specificity, *J. Agric.Food Chem.*, **2003**, 51, 6300-6308
- Dupius, F., Atkinson, J., Liminana, P., Chillon, J.-M.: Captopril improves cerebrovascular structure and function in old hypertensive rats, *Br. J. Pharmacol.*, **2005**, 144, 349-356
- Eichner, K., Ciner-Doruk, M.: Bildung und Stabilität von Amadori-Verbindungen in wasserarmen Modellsystemen, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **1997**, 168, 360-367
- Eisenbrand, G., Schreier, P.: RÖMPP Lexikon der Lebensmittelchemie, 2. völlig überarbeitete und erweiterte Auflage, **2006**, Georg Thieme Verlag Stuttgart
- Eisenbrand, G., Metzler, M., Hennecke, F. J.: Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner. Stoffe, Mechanismen, Prüfverfahren, 3. überarbeitete und aktualisierte Auflage, **2003**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- Erdös, E. G.: The ACE and I: how ACE inhibitors came to be, *FASEB J.*, **2006**, 20, 1034-1038
- Exl, B.-M.: A review of recent developments in the use of moderately hydrolyzed whey formulae in infant nutrition, *Nut. Res.*, **2001**, 21, 355-379
- Fenaille, F., Parisod, V., Visani, P. et al.: Modifications of milk constituents during processing: A preliminary benchmarking study, *Int. Dairy J.*, **2005**, 16, 728-739
- Ferroni, M. A., Giulianotti, P. C., Pietrabissa, A. et al.: Captopril methylation in human liver and kidney: interindividual variability, *Xenobiotica*, **1996**, 26, 877-882
- Ferreira, S. H.: A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothriopsis jararaca*, *Br. J. Pharmacol.*, **1965**, 24, 163-169.
- Ferreira, S. H., Bartelt, D. C., Greene, L. J.: Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothriopsis jararaca* venom, *Biochemistry*, **1970**, 9, 2583-2593
- Findley, J. B. C., Brew, K.: The complete amino-acid sequence of human α -lactalbumin, *Eur. J. Biochem*, **1972**, 27, 65-86
- Finot, P. A., Deutsch, R., Bujard, E.: The extent of the Maillard reaction during the processing of milk, *Prog. Food Nutr. Sci*, **1981**, 5, 345-355
- Finot, P. A., Bujard, E., Mottu, F., Mauron, J.: Availability of the true schiff's base of lysine. Chemical evaluation of the schiff's base between lysine and lactose consequences, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1977**, 343-365

- FitzGerald, R. J., Meisel, H.: Lactokinins: Whey protein-derived ACE inhibitory peptides, *Nahrung* **1999**, *43*, 165-167
- FitzGerald, R. J., Murray, B. A., Walsh, D. J. (2004): Hypotensive peptides from milk proteins, *Am. Nutr. Sci.*, **2004**, *1*, 980-988
- FitzGerald, R. J., Meisel, H.: Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme, *Br. J. Nutr.*, **2000**, *84*, 33-37
- Forsyth, J. S., Reilly, J., Fraser, C. G., Struthers, A. D.: Angiotensin converting enzyme activity in infants is related to birth weight, *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal. Ed.*, **2004**, *89*, 442-444
- Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K.: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 7. völlig neu bearbeitete Auflage, **1998**, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Fugelsang, A., Nilsson, D., Nyborg, N. C.: Characterization of new milk-derived inhibitors of angiotensin converting enzyme in vitro and in vivo, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2003**, *18*, 407-412
- Ganten, D.: Role of animal models in hypertension research, *Hypertension*, **1987**, *9*, 21-42
- Garcia-Banos, J. L., del Castillo, M. D., Sanz, M. L. et al.: Maillard reaction during storage of powder enteral formulas, *Food Chem.*, **2005**, *89*, 555-560
- Gobbetti, M., Minervini, F., Rizzello, C. G.: Angiotensin I-converting-enzyme inhibitory and antimicrobial bioactive peptides, *Int. J. dairy Technol.*, **2004**, *57*, 173-188
- Hanefeld, M., Fischer, S., Schmechel, H. et al.: Diabetes Intervention Study. Multi-intervention trial in newly diagnosed NIDDM, *Diabetes Care*, **1991**, *14*, 308-317
- Hata, Y., Yamamoto, M., Ohni, M. et al.: A placebo-controlled study of the effect of a sour milk on blood pressure in hypertensive subjects, *Am. J. Clin. Nutr.*, **1996**, *64*, 767-771
- Hearn, M. T. W.: HPLC of proteins, peptides and polynucleotides, **1991** VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim
- Henker, J.: Ernährung des gesunden Säuglings, *Ärzteblatt Sachsen* **10/2000**, 465-467
- Henle, T., Walter, H., Krause, I., Klostermeyer, H.: Efficient determination of individual Maillard compounds in heat-treated milk products by amino acid analysis, *Int. Dairy J.*, **1991**, *1*, 125-135
- Hernandez-Ledesma, B., Amigo L., Recio, I.: Preparation of bovine and caprine β -Lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active

- peptides from caprine β -lactoglobulin hydrolysed with thermolysin, *Int. Dairy J.*, **2002**, *12*, 805-812
- Hernandez-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M., Recio, I.: Release of Angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides by simulated gastrointestinal digestion of infant formulas, *Int. Dairy J.*, **2004**, *14*, 889-898
- Hodge, J. E.: Dehydrated Foods - Chemistry of browning reactions in model systems, *J. Agric. Food Chem.*, **1953**, *1*, 928-943
- Horvat, S., Jakas, A.: Peptide and amino acid glycation: New insights into the Maillard Reaction, *J. Peptide Sci.*, **2004**, *10*, 119-137
- Hurrell, R.F., Finot, P. A.: Storage of milk powders under adverse conditions, *Br. J. Nutr.*, **1983**, *49*, 343-354
- Hypertension in Diabetes Study (HDS): II. Increased risk of cardiovascular complications in hypertensive type 3 diabetic patients, *J. Hypertens.*, **1993**, *3*, 319-325
- International Society of Hypertension. European Society of Hypertension – European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension, *J. Hypertens.*, **2003**, *21*, 1011-1053
- Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G., Minick, C. R.: Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: identification by morphologic and immunologic criteria, *J. Clin. Invest.*, **1973**, *52*, 2745-2756
- Jaffe, E. A.: Culture of human endothelial cells, *Transplant Proc.*, **1980**, *12*, 49-53
- Jaspard, E., Wei, L., Alhenc-Gelas, F.: Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (KinasII), *J. Biol. Chem.*, **1993**, *268*, 9496-9503
- Jost, R., Monti, J. C., Pahud, J. J.: Whey protein allergenicity and its reduction by technological means, *Food Technol.*, **1987**, *41*, 118-121
- Kagiyama, S., Tsuchihashi, T., Fujishia, M.: Enhanced depressor response to nitric oxide in the rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats, *Hypertension*, **1998**, *31*, 1030-1034
- Kajimoto, O., Aihara, K., Hirata, H. et al.: Hypotensive effects of tablets containing “Lactotripeptides (VPP, IPP)”, *J. Nutr. Food*, **2001**, *4*, 51-61
- Kajimoto, O., Nakamura, Y., Yada, H. et al.: Hypotensive effect of sour milk drink on mild and moderate hypertensive subjects, *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, **2001**, *23*, 26-31

- Kajimoto, O., Aihara, K., Hirata H. et al.: Safety evaluation of excessive intake of the tablet containing "lactotripeptides (VPP, IPP)" in healthy volunteers, *J. Nutr. Food*, **2001**, 4, 37-46
- Klinke, R., Silbernagl, S.: Lehrbuch der Physiologie, **1994**, Georg Thieme Verlag Stuttgart,
- Koolmann, J., Röhm, K.-H.: Taschenatlas der Biochemie, 2. Auflage, **1998**, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York
- Krause, R.: Untersuchungen zur Bildung von Furosin und N – terminalen 2(1H) – Pyrazinonen, *Dissertation*, 2005, Technische Universität Dresden
- Kuba, M., Tamala, K., Tawata, S. et al.: Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides isolated from tufuyo fermented soybean food, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2003**, 67 (6), 1278-1283
- Kuba, M., Tana, C., Tawata, S., Yasuda, M.: Production of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from soybean protein with monascus purpureus acid proteinase, *Process Biochem.*, **2005**, 40, 2191-2196
- Laffel, L. M., McGill, J. B., Gans, D. J.: The beneficial effect of angiotensin – converting enzyme inhibition with captopril on diabetic nephropathy in normotensive IDDM patients with microalbuminuria, *Am. J. Med.*, **1995**, 99, 497-504
- Ledl F. and Schleicher E.: Die Maillard-Reaktion in Lebensmitteln und im menschlichen Körper - neue Ergebnisse zu Chemie, Biochemie und Medizin, *Angew. Chem.*, **1990**, 102, 597-626
- Lewis, E. J., Hunsicker, L. G., Bain R. P., Rohde, R. D.: The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy, *N. Engl. J. Med.*, **1993**, 329, 1456-1462
- Li, G.-H., Le, G.-W., Shi, Y.-H., Shrestha, S.: Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects, *Nutr. Res.*, **2004**, 24, 469-486
- Lindberg, T., Borulf, S., Jakobsson, I.: Digestion of milk proteins in infancy, *Acta Paediatr. Scand. Suppl.*, **1989**, 351, 29-33
- Löffler, G.: Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie, 4., korrigierte Auflage, **2001**, Springer Verlag Berlin
- Lopez-Fandino, R., Otte J., van Camp, J.: Physiological, chemical and technological peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity, *Int. Dairy J.*, **2006**, 16, 1277-1293

- Martin, M. R., Ness, A. R., Gunnell, D. et al.: Does breast-feeding in infancy lower blood pressure in childhood?: The avon longitudinal study of parents and children (ALSPAC), *Circulation*, **2004**, *109*, 1259-1266
- Matsui, T., Zhu, X. L., Watanabe, K.: Combined administration of captopril with an antihypertensive Val-Tyr dipeptide to spontaneously hypertensive rats attenuates the blood pressure lowering effect, *Life Sci.*, **2006**, *79*, 2492-2498
- Maurer, S.: Bestimmung von α -N-(2-Furoylmethyl)-aminosäuren in peptidhaltigen Lebensmitteln, *wissenschaftliche Abschlussarbeit*, **2005**, TU-Dresden
- Megías, C., Mar Yust, M., Pedroche, J. et al.: Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of sunflower (*Helianthus annuus L.*) protein isolates, *J. Agr. Food Chem.*, **2004**, *52*, 1928-1932
- Meisel, H.: Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins, *John Wiley & Sons, Inc. Biopoly*, **1997**, *43*, 119-128
- Meisel, H., Goepfert, A., Günther, S.: ACE-inhibitory activities in milk products, *Milchwissenschaft*, **1997**, *52*, 307-311
- Michaud, A., Williams, T. A., Chauvet, M.-T., Corvol, P.: Substrate dependence of angiotensin I-converting enzyme inhibition: Captopril displays a partial selectivity for inhibition of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline hydrolysis compared with that of angiotensin I, *Mol. Pharmacol.*, **1997**, *51*, 1070-1076
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K. et al.: Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk, *J. Dairy Sci.*, **1995a**, *78*, 777-783
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Takano, T.: Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors of angiotensin I-converting enzyme, *J. Dairy Sci.*, **1995b**, *78*, 1253-1257
- Nasipour, A., Scher, J., Desobry, S.: Baby Foods: Formulation and interactions (A Review), *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2006**, *46*, 665-681
- Nitta, K., Sugai, S.: The evolution of lysozyme and α -lactalbumin, *Europ. J. Biochem.*, **1989**, *182*, 111-118
- Okamoto, K., Aoki, K.: Development of a strain of spontaneously hypertensive rats, *Jap.Circ.J.*, **1963**, *27*, 282-293
- Pahud, J. J., Monti, J. C., Jost, R.: Allergenicity of whey protein: its modifications by tryptic in vitro hydrolysis of the protein, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **1985**, *4*, 408-413

- Partschefeld, C., Richter, S., Schwarzenbolz, U., Henle, T.: Modification of beta-lactoglobulin by microbial transglutaminase under high hydrostatic pressure: Localization of reactive glutamin residues, *Biotechnol. J.*, **2007**, 2, 462-468
- Penndorf, I., Biedermann, D., Maurer, S. V., Henle, T.: Studies on n-terminal glycation of peptides in hypoallergenic infant formulas: Quantification of α -N-(2-furoylmethyl) amino acids, *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, 55, 723-727
- Pexa, A.: Alimentäres Methionin und Hyperhomocysteinämie, *Dissertation*, **2006**, TU-Dresden
- Pihlanto-Leppälä, A.: Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ACE-inhibitory peptides, *Trends Food Sci. Technol.*, **2001**, 11, 347-356
- Rošćić, M., Horvat, S.: Transformations of bioactive peptides in the presence of sugars – Characterization and stability studies of the adducts generated via the Maillard reaction, *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, 14, 4933-4943
- Morrison, R. A., Kripalani, K. J., Marino, A. M. et al.: Intestinal absorption of Captopril and two thioester analogs in rats and dogs, *Biopharm. Drug Dispos.*, **1997**, 25-39
- Salaymeh, B., Lee, M. F., Weghemmeger, J. A.: A comparison of CNS angiotensin II binding in the hypothalamus-thalamus-septum-midbrain region of developing spontaneously hypertensive and normotensive rats, *J. Hypertens.*, **1986**, 4, 617-622
- Satake, M., Enjoh, M., Nakamura, Y., Takano, T. et al.: Transepithelial transport of the bioactive tripeptide, Val-Pro-Pro, in human intestinal Caco-2 Cell monolayers, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2002**, 66, 378-384
- Sato, M., Hosokawa, T., Yamaguchi, T. et al.: Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from Wakame (*Undaria pinnatifida*) and their antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats, *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 6245-6252
- Schwabe U., Pfaffrath E.: Arzneiverordnungs-Report 2006, Springer, Berlin, **2006**
- Schwenke, K. D., Mothes, R.: Food Protein – Structure and functionality, **1992**, VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim
- Shah, N. P.: Effects of milk-derived bioactives: An overview, *Br. J. Nutr.*, **2000**, 84, 3-10
- Sienkiewicz, T.: Nomenklatur und einige Eigenschaften der Molkenproteine. 2. Mitt. α -Lactalbumin, Immunoglobuline, Proteose-Peptide, Minorproteine und Enzyme, *Die Nahrung*, **1981**, 25, 335-343
- Silvan, J. M., van de Lagemaat, J., Olana, A., Del Castillo, M. D.: Analysis and biological properties of amino acid derivatives formed by Maillard reaction in food, *J. Pharm.*

- Biomed. Anal.*, **2006**, *41*, 1543-1551
- Smyth, M.: Relationship between some characteristics of WPC hydrolysates and the enzyme complement in commercially available proteinase preparations, *Int. Dairy J.*, **1998**, *8*, 819-827
- St. Louvent, E., Locquet, N., Stahl, P., Birlouez-Aragon, I.: Protein hydrolysis of infant formulas strongly activates the Maillard reaction, *Reports from the World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition*, **2nd**, Paris, France, July 3-7, **2004**
- Szajewska, H., Albrecht, P., Stoitiska, B. et al.: Extensive and partial protein hydrolysate preterm formulas: The effect on growth rate, protein metabolism indices, and plasma amino acid concentration, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **2001**, *32*, 303-309
- Tauzin, J., Miclo, L., Gaillard, J.-L.: Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from tryptic hydrolysate of bovine α_{S2} -casein, *FEBS Lett.*, **2002**, *531*, 369-374
- vanBoekel, M. A. J. S.: Effect of heating on Maillard reactions in milk, *Food Chem.*, **1998**, *62*, 403-414
- Vermeirssen, V., Van Camp, J., Verastraete, W.: Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides, *Br. J. Nutr.*, **2004**, *92*, 357-366
- Wahn, U., Reibel, S., Niggemann, B.: Hypoallergene Säuglingsnahrungen – wo stehen wir heute?, *Kinder- und Jugendarzt*, **2000**, *31*, 583
- Walker, W. A.: Absorption of protein and protein fragments in the developing intestine: Role in immunologic/allergic reactions, *Pediatrics*, **1985**, *75*, 161-171
- Walter, T., Faber, R., Maul, B. et al.: Fetal, neonatal cord, and maternal plasma concentrations of angiotensin-converting enzyme (ACE), *Prenat. Diagn.*, **2002**, *22*, 111-113
- Wei, L., Alhenc-Gelas, F., Corvol, P., Clauser, E.: The two homologous domains of human angiotensin 1-converting enzyme are both catalytically active, *J. Biol. Chem.*, **1991**, *266*, 9002-9008
- Wei, L., Clauser, E., Alhenc-Gelas, F., Corvol, P.: The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme interact differently with competitive inhibitors, *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*, 13398-13405
- Wijnen H. J., De Kloet, E. R., Versteeg, D. H., De Jong, W.: Noradrenaline concentration and turnover in nuclei of the hypothalamus and the medulla oblongata at two stages in the development of renal hypertension in the rat, *Brain Res.*, **1989**, *198*, 411-417

- Worland, P. J., Drummer, O. H., Jarrott, B.: Gastric and intestinal absorption of Captopril in acutely and chronically treated rats: Comparison with salicylic acid, *J. Pharm. Sci.*, **1984**, 1755-1758
- Wu, J. P., Ding, X. L.: Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides, *Food Res. Int.*, **2002**, 35, 367-375
- Zöllner, H.: Handbook of Enzyme Inhibitors, 3. Auflage, **1999**, VCH Verlags-gesellschaft mbH Weinheim

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die Dissertation wurde an der Technischen Universität Dresden unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr.-Ing. habil. Thomas Henle, Professur für Lebensmittelchemie, angefertigt.

Erfolglose Promotionsverfahren haben durch mich bis jetzt nicht stattgefunden.

Die Promotionsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden in der aktuell gültigen Fassung erkenne ich in allen Teilen an.

Melanie Martin